

Testy obciążeniowe *Listeria monocytogenes* w produktach mleczarskich

Alicja Kośmider

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-627 Poznań
alicja.kosmider@up.poznan.pl

W świecie produkcji żywności łatwo ulec złudnemu poczuciu bezpieczeństwa. Rutyna jest zazwyczaj podobna: partia towaru zjeżdża z linii, próbka trafia do laboratorium, a po kilku dniach otrzymujemy raport z wynikiem ujemnym. „Produkt bezpieczny” – myślimy, zwalniając blokadę magazynową. A jeśli to tylko część prawdy?

Wielu producentów opiera ocenę bezpieczeństwa żywności na rutynowych badaniach mikrobiologicznych gotowego wyrobu, ograniczając się do analiz typu „wynik w dniu produkcji” czy „wynik na koniec terminu przydatności do spożycia”. Pojawia się jednak zasadnicze pytanie: czy taki punktowy obraz rzeczywistości jest wystarczającym gwarantem bezpieczeństwa w całym, dynamicznym „cyklu życia” produktu? Standardowe badanie mówi nam jedynie o tym, co dzieło się z produktem w ułamku sekundy, w którym pobrano próbkę. Bezpieczeństwo mikrobiologiczne nie jest stanem statycznym, danym raz na zawsze w momencie pakowania. To proces, który musimy udowodnić w czasie [7]. Prawdziwym wyzwaniem dla managera jakości i właściciela firmy nie jest pytanie: „czy patogen tam jest teraz?”, ale: „co się stanie, jeśli tam trafi i dostanie czas na rozwój w rękach konsumenta?”.

Mikrobiologiczne bezpieczeństwo żywności stanowi jeden z kluczowych elementów systemu kontroli jakości w zakładach produkcyjnych. Istotnym zagrożeniem w tym obszarze jest możliwość występowania mikroorganizmów patogennych, wśród których szczególne znaczenie mają bakterie *Listeria monocytogenes*, będące czynnikiem etiologicznym listeriozy [13].



W matrycach żywnościowych *Listeria monocytogenes* wykazują wysoką tolerancję na warunki stresowe środowiska. Szczególnie istotną i zarazem niebezpieczną cechą tych bakterii jest zdolność do namnażania się w temperaturach bliskich 0°C, czyli takich, które uznawane są za prawidłowe podczas przechowywania żywności. Sprawia to, że produkty chłodzone o długim terminie przydatności mogą stanowić potencjalne źródło zakażenia [9]. Zdolność *Listeria monocytogenes* do tworzenia biofilmów w środowisku produkcyjnym dodatkowo zwiększa ryzyko wtórnej kontaminacji produktów już po procesie technologicznego przetworzenia [15].

Do grupy produktów wysokiego ryzyka należą produkty gotowe do spożycia (RTE, *ready-to-eat*) o neutralnym pH i wysokiej aktywności wody [16]. W kontekście przemysłu mleczarskiego będą to m.in. sery twarogowe, kremowe, pleśniowe, fermentowane produkty mleczne (np. jogurty), masło, oraz przetwory mleczne pakowane próżniowo [9]. Na świecie istnieje wiele rodzajów serów różniących się procesem produkcji oraz właściwościami fizykochemicznymi. Przykładowo, w serach niedojrzewających pH może wynosić od 4,2 do 7,3 przy aktywności wody powyżej 0,99. W przypadku skórki serów dojrzewających miękkich, półtwardych lub twardych (np. Brie, Camembert, Gorgonzola) odnotowano pH powyżej 7,5, co związane było z rozwojem mikroflory powierzchniowej i jej aktywnością metaboliczną [5]. Próbkę serów o właściwościach niesprzających wzrostowi *Listeria monocytogenes* są rzadkie. Ponieważ bakterie te są wszechobecne, produkcja serów całkowicie wolnych od tego patogenu pozostaje wyzwaniem. Obecność bakterii nie oznacza jednak automatycznie ich zdolności do wzrostu lub nawet przetrwania [8].

Zgodnie z danymi European Food Safety Authority (EFSA) oraz European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) łączna liczba potwierdzonych przypadków listeriozy w 2024 r. wyniosła 3041, co odpowiada współczynnikowi zapadalności na poziomie 0,69 na 100 000 mieszkańców. Z przeprowadzonej analizy epidemiologicznej wynika, że źródłem części zakażeń były produkty i przetwory mleczne RTE. Szacuje się, że ekspozycja na skażone wyroby z tej kategorii odpowiadała średnio za 0,40% ogółu przypadków listeriozy [3]. Obecność *Listeria monocytogenes* stwierdzono w 0,39% próbek serów wytwarzanych z mleka pasteryzowanego, w 1,6% próbek serów produkowanych z mleka surowego lub poddanego łagodnej obróbce cieplnej oraz w 0,18% próbek mleka. Wśród przebadanych próbek 77,6% serów wyprodukowano z mleka krowiego [3].

Pomimo relatywnie niskiego odsetka wykrywalności *Listeria monocytogenes* w produktach RTE, w tym w produktach i przetworach mlecznych, dane dotyczące przebiegu klinicznego wywołanej przez nie choroby wskazują na jej ciężki przebieg, czego wyrazem jest odsetek hospitalizacji wynoszący 97,3% oraz śmiertelność na poziomie 15,6% w 2024 roku. Analiza trendu z lat 2020–2024 wskazuje na tendencję wzrostową liczby zakażeń [3]. Dane te należy więc potraktować jako ostrzeżenie epidemiologiczne i dowód na konieczność stałego monitorowania bezpieczeństwa żywności w Unii Europejskiej.



W związku z istotnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego, Komisja Europejska podjęła działania legislacyjne mające na celu zaostreżenie kryteriów bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności. W dniu 11 grudnia 2024 r. weszło w życie Rozporządzenie Komisji (UE) 2024/2895, zmieniające Rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w zakresie kryteriów mikrobiologicznych odnoszących się do obecności *Listeria monocytogenes* w żywności gotowej do spożycia. Nowelizacja obejmuje środki spożywcze należące do kategorii 1.2 załącznika I wskazanego rozporządzenia, tj. produkty, w których możliwy jest wzrost *Listeria monocytogenes*, z wyłączeniem żywności przeznaczanej dla niemowląt oraz żywności specjalnego przeznaczenia medycznego [11, 12]. Nowe regulacje, które zaczną obowiązywać w lipcu 2026 roku, wprowadzają rygorystyczny wymóg braku obecności bakterii *Listeria monocytogenes* w produktach gotowych do spożycia. Odstępstwo od powyższego wymogu dopuszczalne jest tylko w przypadku, gdy podmiot działający na rynku spożywczym jest w stanie udokumentować, w sposób akceptowalny dla właściwego organu urzędowej kontroli żywności, że poziom *Listeria monocytogenes* nie przekroczy wartości 100 jtk/g w całym deklarowanym okresie przydatności produktu do spożycia [11, 12].

W praktyce oznacza to, że producent będzie musiał zagwarantować, że wytwarzany przez niego produkt nie będzie zawierał *Listeria monocytogenes* nie tylko w momencie opuszczenia zakładu, ale również przez cały okres przydatności do spożycia w trakcie jego dystrybucji. Ze względu na nierównomierny rozkład i możliwą niską częstość występowania *Listeria monocytogenes* w partii żywności, żaden plan pobierania próbek i badań mikrobiologicznych nie jest w stanie całkowicie zagwarantować ich braku w partii. W związku z tym zarządzanie bezpieczeństwem żywności nie może być oparte wyłącznie na badaniach produktu końcowego [4, 11, 12]. Co zatem należy zrobić w tej sytuacji?

Uzupełnieniem tradycyjnych badań mikrobiologicznych są metody bardziej zbliżone do rzeczywistych warunków przechowywania i dystrybucji. Do najważniejszych narzędzi tego typu należą badania trwałościowe, mikrobiologia prognostyczna oraz badania obciążeniowe określane jako *challenge tests* [2]. Badania trwałościowe pozwalają ocenić wzrost *Listeria monocytogenes* w naturalnie skażonej żywności. Ich wadą jest trudność interpretacji wyników wynikająca z prawdopodobieństwa wykrycia skażonych próbek, niskiego poziomu oraz nierównomiernego rozkładu początkowej kontaminacji [14]. Mikrobiologia prognostyczna (predyktywna) z kolei umożliwia ocenę zdolności *Listeria monocytogenes* do wzrostu oraz tempa ich namnażania na podstawie modeli matematycznych uwzględniających parametry fizykochemiczne produktu, takie jak skład, pH czy aktywność wody. Stanowi przy tym metodę stosunkowo taną i niewymagającą czasochłonnnych badań laboratoryjnych. Modele predykcyjne opierają się głównie na szczepach wzorcowych, podczas gdy szczepy obecne w rzeczywistych produktach mogą wykazywać odmienne właściwości fizjologiczne i inne tempo wzrostu [1]. Narzędzie to jest jednak niezwykle pomocne do oceny ryzyka przy wstępnym projektowaniu składu produktu [10].



Badania obciążeniowe dostarczają nam natomiast dowody o wysokiej wartości praktycznej: pokazują, co dzieje się z patogenem w konkretnym produkcie, a nie „średnio” w tej kategorii żywności. Polegają na analizie zdolności wzrostu lub przeżywania mikroorganizmów celowo wprowadzonych do produktu w ściśle kontrolowanych, realistycznych warunkach pakowania (np. MAP/vacuum), przechowywania oraz w obecności naturalnej mikrobioty występującej w produkcie w trakcie całego cyklu życia produktu [2, 14]. Ocena bezpieczeństwa produktu obejmuje wyznaczenie potencjału wzrostu (δ) oraz - w produktach umożliwiających rozwój badanych mikroorganizmów – maksymalnego tempa wzrostu ($\mu_{\max}$). Badania te pozwalają ocenić dynamikę namnażania oraz zweryfikować, czy liczebność patogenu na koniec okresu przydatności do spożycia nie przekroczy ustalonego kryterium [4, 6].

Przeprowadzenie testu obciążeniowego bakterii *Listeria monocytogenes* w badanej próbce nabiału, np. w twarogu, wymaga ścisłego przestrzegania procedur mikrobiologicznych, które gwarantują wiarygodność wyników w kontekście bezpieczeństwa żywności. Pierwszym etapem jest odpowiedni dobór szczepów oraz przygotowanie inokulum. Zgodnie z wytycznymi unijnymi, do badania należy wykorzystać mieszaninę bakterii składającą się z co najmniej 3 do 5 szczepów *Listeria monocytogenes* [4, 6]. Najbardziej miarodajne wyniki uzyskuje się, gdy szczepy pochodzą z podobnych produktów nabiałowych lub bezpośrednio ze środowiska produkcyjnego danej mleczarni. Przed zaszczepieniem produktu bakterie poddaje się procesowi adaptacji do warunków chłodniczych poprzez przetrzymywanie w niskiej temperaturze [4, 6]. Kolejnym kluczowym krokiem jest precyzyjna inokulacja produktu. Celem zakażenia jest wprowadzenie niskiej dawki bakterii, wynoszącej zazwyczaj około 100 jtk/g, pozwalającej na monitorowanie ewentualnego wzrostu populacji do limitu bezpieczeństwa w trakcie całego okresu przydatności. Metoda wprowadzania bakterii musi być jak najmniej inwazyjna, aby nie zmienić struktury badanego produktu, jego pH oraz aktywności wody. Z tego powodu objętość dodanej zawiesiny drobnoustrojów nie powinna przekraczać 1% całkowitej masy badanej próbki [4, 6, 14]. Ważną częścią badań obciążeniowych są też "próbki ślepe" (zaszczepione taką samą ilością sterylnej soli fizjologicznej, badane równolegle do zaszczepionych próbek), by sprawdzić naturalną mikrobiotę badanego produktu. Próbkę przygotowuje się w docelowych opakowaniach z odpowiednią atmosferą gazów i poddaje się procesowi przechowywania w warunkach symulujących realny łańcuch chłodniczy [4, 6]. Zgodnie z protokołami EURL dla *Listeria monocytogenes* czas trwania testu dzieli się na etapy: część czasu produkt przebywa w temperaturze producenta (np. 5°C), natomiast pozostały okres w temperaturze symulującej warunki w lodówce konsumenta, którą najczęściej przyjmuje się na poziomie 7°C lub 9°C. Ostatnim etapem jest analiza i interpretacja uzyskanych wyników. W określonych odstępach czasu, obejmujących co najmniej dzień rozpoczęcia testu, połowę okresu przechowywania oraz koniec terminu przydatności, pobiera się próbki do badań ilościowych uprzednio monitorując skład gazów wewnątrz opakowania, aby upewnić się, że bariera ochronna jest skuteczna [4, 6].



Na podstawie wyników badań mikrobiologicznych oblicza się potencjał wzrostu (δ), będący różnicą między logarytmem liczby bakterii na końcu testu a logarytmem liczby na początku badania. Jeżeli uzyskany wynik jest większy niż 0,5 log jtk/g uznaje się, że produkt wspiera wzrost *Listeria monocytogenes*. W przypadku, gdy wartość potencjału wzrostu (δ) jest mniejsza lub równa 0,5 log jtk/g, produkt klasyfikuje się jako produkt uniemożliwiający wzrost tych bakterii. Dla matryc wskazujących na możliwość namnażania *Listeria monocytogenes* można wyznaczyć również maksymalne tempo wzrostu patogenu ($\mu_{\max}$) i ocenić, jak szybko bakterie będą namnażać się w produkcie i czy pomimo wzrostu w trakcie okresu przydatności do spożycia ich liczebność nie przekroczy dopuszczalnych poziomów bezpieczeństwa [4,6]. Podstawowym źródłem metodycznym dla tych procedur jest dokument techniczny EURL dla *Listeria monocytogenes* oraz norma ISO 20976-1, a badania wykonywane są najczęściej przez wykwalifikowane laboratoria analityki żywności.

Podsumowanie

Challenge testy to przejście z ery „nadziei na bezpieczeństwo” do ery „zarządzania dowodami”. Testy te budują wiarygodność w oczach audytorów, sieci handlowych i przede wszystkim konsumentów. Współczesny przemysł spożywczy funkcjonuje w niezwykle złożonym łańcuchu dostaw. Produkt, który opuszcza linię produkcyjną trafia do świata pełnego zmiennych: wahań temperatury w transporcie, różnej wydajności lodówek sklepowych czy wreszcie domowych chłodziarek konsumentów, które nie zawsze trzymają rygorystyczne 5°C. Test obciążeniowy jest narzędziem, które pozwala „zasymulować przyszłość” i sprawdzić, jak *Listeria monocytogenes* zachowa się w tych nieidealnych warunkach. W dobie błyskawicznego przepływu informacji, jeden incydent związany z obecnością chorobotwórczych *Listeria* może zrujnować reputację firmy budowaną przez dekady. W nowoczesnym przemyśle spożywczym raport z badania obciążeniowego jest najlepszą polisą ubezpieczeniową.

Literatura:

1. Aryani D.C., den Besten H.M.W., Hazeleger W.C., Zwietering M.H. (2015). Quantifying strain variability in modeling growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 208:19–29.
2. D’Ambrosio G., Schirone M., Paparella A. (2026). *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Risk perspectives across different regulatory systems. Foods, 15(3):470.
3. EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2025). The European Union One Health 2024 Zoonoses Report. EFSA Journal, 23, e9759.
4. European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* (EURL Lm) (2021). Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Version 4. Maisons-Alfort: ANSES – Laboratory for Food Safety.



5. Gérard A., El-Hajjaji S., Van Coillie E., Bentaïb A., Daube G., Sindic M. (2020). Determination of the growth potential of *Listeria monocytogenes* in various types of Belgian artisanal cheeses by challenge tests. Food Microbiol. 92:103582.
6. International Organization for Standardization (ISO) (2019). ISO 20976-1:2019. Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products — Part 1: Challenge tests to study growth, inactivation and survival of microorganisms. Geneva: ISO.
7. Jackowska-Tracz A. (2022). Testy obciążeniowe (tzw. challenge) w ocenie stabilności mikrobiologicznej żywności RTE. Przem. Spoż. 76(9):18-23.
8. Kapetanakou A.E., Gkerekou M.A., Vitzilaiou E.S., Skandamis P.N. (2017). Assessing the capacity of growth, survival, and acid adaptive response of *Listeria monocytogenes* during storage of various cheeses and subsequent simulated gastric digestion. Int. J. Food Microbiol. 246: 50–63.
9. Łobacz A., Niewińska J., Kowalik J., Żulewska J. (2025). Potencjał bakterii fermentacji mlekowej w kontroli *Listeria monocytogenes* w przetwórstwie mleczarskim. Przegl. Mlecz. 8 (online).
10. Membré J.-M., Lambert R.J.W. (2008). Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment. Int. J. Food Microbiol. 128(1):10–15.
11. Rozporządzenie Komisji (UE) (2024). 2024/2895 zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w odniesieniu do *Listeria monocytogenes*.
12. Rozporządzenie Komisji (WE) (2005). nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych.
13. Sip A. (2010). Bakterie *Listeria monocytogenes*. Cz. I. Występowanie i źródła zanieczyszczeń żywności. Przem. Spoż. 64(9): 40-43.
14. Spanu C., Scarano C., Ibba M., Pala C., Spanu V., De Santis E.P. (2014). Microbiological challenge testing for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat: A practical approach. Ital. J. Food Saf. 3:4518.
15. Voglauer E.M., Alteio L.V., Pracser N., Thalgutner S., Quijada N.M., Wagner M., Rychli K. (2025). *Listeria monocytogenes* colonises established multispecies biofilms and resides within them without altering biofilm composition or gene expression. Microbiol. Res. 292: 127997.
16. Yangchen J., Sarkar D., Rood L., Vaskoska R., Kocharunchitt C. (2025). *Listeria monocytogenes*: A continuous global threat in ready-to-eat (RTE) foods. Foods, 14(21): 3664.