

# Resistência térmica de *Salmonella* Enteritidis, *S. Panama* e *S. Infantis* em fórmula láctea infantil reconstituída

## *Salmonella* Enteritidis, *S. Panama* and *S. Infantis* thermal resistance in reconstituted infant milk formula

RIALA6/1059

Ruth Estela G. ROWLANDS<sup>1\*</sup>, Alexandra André dos S. PAPASIDERO<sup>1</sup>, Ana Maria R. de PAULA<sup>1</sup>, Cristiane B. CANO<sup>2</sup>, Dilma S. GELLI<sup>1</sup>

\* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, <sup>1</sup> Seção de Microbiologia Alimentar, Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-902, SP.e-mail: reg\_rowlands@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Seção de Bebidas, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

Recebido: 23/03/2006 – Aceito para publicação: 31/05/2006

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência térmica de *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis* em fórmula láctea infantil em pó reconstituída, experimentalmente contaminada. As amostras de leite reconstituídas foram contaminadas e submetidas às temperaturas de 60°, 70° e 80°C, em banho de imersão, por 5 minutos. A quantificação de *Salmonella* spp. foi realizada pela técnica do NMP (Número Mais Provável). Após o tratamento térmico a 60°C, houve um decréscimo na população de *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis* de, em média, 5,13; 4,63 e 4,82 ciclos logarítmicos, respectivamente. Com o aquecimento a 70°C as reduções médias foram de 6,42; 5,56 e 6,56 ciclos logarítmicos, respectivamente. A 80° C não se detectou *Salmonella* spp. nas amostras analisadas. Por meio da análise de comparação múltipla de Tukey observou-se que não houve diferença significativa, com relação à resistência térmica, entre as três cepas de *Salmonella* estudadas às temperaturas de 60° C e 70°C. Os resultados do presente estudo demonstraram que os tratamentos térmicos a 60 e 70°C/5 minutos não foram suficientes para eliminar toda população de *Salmonella* spp. (10<sup>6</sup> NMP/mL) inoculada na fórmula láctea infantil, demonstrando a importância dos cuidados nas etapas de preparo e manipulação desses alimentos, consideradas como pontos críticos de controle.

**Palavras-Chave.** *Salmonella*, resistência térmica, fórmula láctea infantil

### ABSTRACT

The objective of the present trial was to evaluate the thermal resistance of *S. Enteritidis*, *S. Panama* and *S. Infantis*, which were experimentally inoculated into the reconstituted infant milk formula. Samples of contaminated reconstituted milk were submitted to 60°, 70°, and 80°C in a water - bath for 5 minutes. *Salmonella* spp. quantification was performed by means of Most Probable Number (MPN) technique. After thermal treatment at 60°C, the mean count reductions in population of *S. Enteritidis*, *S. Panamá*, and *S. Infantis* were equal to 5.13, 4.63, and 4.82 log cycles, respectively. In heating at 70°C, the means reductions were 6.42, 5.56, and 6.56 log cycles, respectively. At 80°C there was no recovery of *Salmonella* spp. from analysed samples. Tukey's multiple comparison analysis showed that there were no significant differences on thermal resistance of three *Salmonella* strains at 60°C and 70°C. The present study showed that the treatments at 60° and 70°C for 5 minutes were not enough to eliminate all *Salmonella* spp. population (10<sup>6</sup> MPN/mL) experimentally inoculated into the infant milk, showing the importance of the precautions during the milk manufacturing and manipulation steps, which were considered critical control points in preparing these foods.

**Key Words.** *Salmonella*, thermal resistance, infant milk formula

## INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Salmonella* são microrganismos de grande importância em Saúde Pública. Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países revelam que dentre os agentes etiológicos das doenças transmitidas por alimentos (DTAs), a salmonela é o patógeno mais comumente envolvido<sup>1,2</sup>. No ano de 2004, ocorreram nos EUA 15.806 casos de DTAs ocasionados por bactérias patogênicas, sendo 6.464 (40,9%) causados por *Salmonella*<sup>3</sup>. No Estado de São Paulo, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde (CVE/SES – SP), dentre os 69 surtos notificados de origem bacteriana, no ano de 2002, 31 (44,9%) foram ocasionados por *Salmonella* spp., com um total de 534 casos<sup>4</sup>.

Em crianças e recém-nascidos, as infecções por *Salmonella* spp. podem ser severas ocorrendo septicemia com seqüelas e morte<sup>5,6</sup>. Alimentos destinados a este grupo populacional, como as fórmulas lácteas infantis, podem ser veiculadores deste patógeno. As fórmulas líquidas, prontas para consumo, são comercialmente estéreis, no entanto, os produtos em pó não são esterilizados, podendo apresentar contaminação. Dentre os surtos descritos, há relatos no Brasil, EUA, França, Reino Unido, Espanha e Korea com isolamento de *Salmonella* spp. em amostras de fórmulas lácteas em pó e reconstituídas<sup>7,8,9,10,11,12,13</sup>. Embora outras bactérias tenham sido isoladas de fórmulas infantis, a ocorrência de doenças associadas ao consumo destes produtos, somente foi confirmada para aqueles contaminados com *Salmonella* spp. e *Enterobacter sakazakii*<sup>14</sup>.

A contaminação das fórmulas infantis em pó, por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, pode ocorrer durante seu processamento na indústria, sendo as áreas de suplementação (adição de ingredientes), desidratação e embalagem (ambiente) as principais fontes de contaminação<sup>14,15</sup>. Além disso, durante o preparo do alimento para o consumo, diversos fatores podem contribuir para a ocorrência de patógenos no produto, tais como: uso de água contaminada para reconstituição, manipulação em condições higiênicas inadequadas e abusos no binômio tempo x temperatura<sup>16,17,18</sup>.

O tratamento térmico pode ser considerado um ponto crítico de controle para eliminação de patógenos em diversos alimentos, entretanto, a eficiência deste processo depende de informações sobre o comportamento do microrganismo em um determinado substrato durante seu aquecimento. O tratamento apropriado deve, ainda, ser suficiente para inativar o patógeno de interesse, sem interferir na composição nutricional do alimento<sup>19</sup>.

De acordo com a FAO/OMS<sup>14</sup>, o risco de uma criança adoecer devido ao consumo de fórmulas infantis contaminadas pode ser minimizado utilizando água fervente para reconstituir o produto ou pelo aquecimento da fórmula após reconstituição. As informações sobre resistência térmica de *Salmonella* spp. em fórmulas lácteas infantis são de fundamental importância para que os processos térmicos sejam aplicados de maneira eficiente, garantindo a inocuidade do alimento.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resistência térmica de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Panama e *Salmonella* Infantis, em leite em pó infantil reconstituído, laboratorialmente

contaminado e submetido às temperaturas de 60, 70 e 80°C por 5 minutos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Seleção e preparo das cepas de *Salmonella*

As cepas de *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis*, utilizadas neste estudo, foram isoladas, de alimento à base de carne de peru envolvida em doença de origem alimentar, de uma amostra de água envolvida em surto e de carne moída crua, enviadas a Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz Central, respectivamente.

### Reconstituição da fórmula láctea

Utilizou-se leite em pó infantil e com contagem de bactérias mesófilas inferior a 10 UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia). Para reconstituição da fórmula, foram homogeneizados 100 gramas do produto em 500 ml de água destilada esterilizada.

### Contaminação da fórmula láctea reconstituída

As cepas, mantidas em gelose conservação, foram reativadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 35°C/18-24 horas. Para realização dos ensaios, com cada uma das três cepas, 1 mL da cultura em BHI foi inoculado em 500 mL da fórmula reconstituída. Procedeu-se a homogeneização por agitação do frasco.

### Tratamento térmico

A fórmula láctea contaminada (500 mL) foi dividida em 4 porções (3 de 100 mL e uma de 200 mL). Os três frascos contendo 100 mL foram submetidos separadamente às temperaturas de 60, 70 e 80°C, em um banho-maria (DUBNOFF modelo 144), por 5 minutos, após a amostra ter alcançado a temperatura desejada. Durante o período de 5 minutos a temperatura do leite e do banho foram monitoradas. O frasco contendo 200 mL da amostra não tratada foi utilizado para avaliação da concentração inicial de *Salmonella*. Foram realizados 5 experimentos com cada uma das cepas.

### Quantificação da *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp., nas amostras tratadas e não tratadas termicamente, foi realizada de acordo com metodologia descrita na ISO<sup>20</sup>, com algumas modificações. A etapa de enriquecimento seletivo, que tem como objetivo inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação preferencial do número de células de *Salmonella* spp., foi dispensada, uma vez que o estudo foi realizado com leite em pó infantil, experimentalmente contaminado, e com contagem inicial de bactérias mesófilas inferior a 10 UFC/ml.

A quantificação do microrganismo foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP) segundo Peeler et al.<sup>21</sup>. Uma série de 3 tubos, contendo cada um 10 mL de água peptonada tamponada (APT) 1% concentração dupla, foi semeada com 10

mL da amostra submetida ao tratamento térmico (não diluída) previamente homogeneizada. Em seguida, 25 mL de amostra, de cada frasco, foi homogeneizado em 225 mL de água peptonada 1% (APT 1%), obtendo-se a diluição  $10^{-1}$ . Diluições decimais seriadas foram realizadas para se obter as diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Séries de 3 tubos, contendo cada um 10mL de APT 1% concentração simples, foram semeadas com 1 mL das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Os tubos foram incubados a  $35^{\circ}\text{C}/24$  horas.

Para a quantificação da concentração inicial de *Salmonella* spp., presente na fórmula láctea antes do tratamento térmico, foram realizadas diluições decimais seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ , utilizando-se em seguida a técnica de NMP.

Os tubos que apresentavam turvação foram semeados em dois meios seletivos e diferenciais para salmonela: SS (ágar *Salmonella-Shigella*) (Diagnostic Pasteur 64514) e BG (ágar verde brilhante) (Merck 107232). As placas foram incubadas a  $35^{\circ}\text{C}/24$  horas e as colônias características de *Salmonella* spp. foram inoculadas em meio IAL<sup>22</sup> para identificação bioquímica.

### Cálculo do valor D

O valor D corresponde ao tempo necessário para reduzir 90% (=1 redução Log) da população microbiana (tempo de redução decimal)<sup>23</sup>. O valor D foi determinado para cada uma das três cepas estudadas de acordo com a seguinte equação:  $D = t / (\text{Log } N_0 - \text{Log } N)$ , onde  $t$  corresponde ao tempo de aquecimento em minutos,  $\text{Log } N_0$  é o número inicial do microrganismo (Log NMP/mL) e  $\text{Log } N$  é o número final de células após o tratamento térmico (Log NMP/mL)<sup>24</sup>.

### Análise Estatística

Os dados são apresentados com suas respectivas médias  $\pm$  desvio-padrão. Uma análise de correlação entre: população ( $\log_{10}$  NMP) e temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) foi realizada empregando-se o teste- $t$ , com nível de significância de 95%, para verificar se a correlação entre essas variáveis era significativa. Para obter uma relação quantitativa entre estas variáveis foi aplicada uma análise de regressão linear com nível de significância de 95% e construídos intervalos de confiança e de predição para o modelo gerado. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o pacote estatístico Minitab for Windows, v. 13.31<sup>25</sup>.

Para verificar se houve diferença significativa com relação à resistência térmica entre as três cepas estudadas foi realizada uma comparação múltipla de Tukey com nível de significância de 95%.

## RESULTADOS

Após o tratamento térmico a  $60^{\circ}\text{C}$ , houve um decréscimo na população de *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis* de, em média, 5,13; 4,63 e 4,82 ciclos logarítmicos, respectivamente. Com o aquecimento a  $70^{\circ}\text{C}$  as reduções médias foram de 6,42; 5,56 e 6,56 ciclos logarítmicos, respectivamente. Após tratamento a  $80^{\circ}\text{C}$ , não houve recuperação de células viáveis em nenhum dos experimentos realizados (Tabela 1).

Os resultados da análise de regressão linear, para *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis*, indicam uma forte correlação entre a população de *Salmonella* spp. e a temperatura ( $R^2=0,976$ ,  $0,955$  e  $0,968$ , respectivamente), significativa no nível de 95% de confiança, de acordo com os resultados do teste- $t$ .

Os valores D calculados para as temperaturas de  $60^{\circ}\text{C}$  e  $70^{\circ}\text{C}$  foram:  $D_{60} = 0,97$ ;  $1,08$  e  $1,04$  min. e  $D_{70} = 0,78$ ;  $0,90$  e  $0,76$  min. para *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis*, respectivamente.

## DISCUSSÃO

A resistência térmica de um microrganismo depende de diferentes fatores como concentração de bactérias no substrato, microbiota competidora presente, fase em que se encontra a população bacteriana e das propriedades e composição do substrato (pH, Aw, gorduras, proteínas, sólidos totais, entre outros). A presença de gorduras e proteínas nos alimentos exerce efeito protetor sobre os microrganismos<sup>26</sup>. No leite, a interação entre a fração proteica e cátions bivalentes, presentes no soro, pode estar associada com a proteção da *Salmonella* aos tratamentos térmicos<sup>27</sup>.

Os valores  $D_{60}$  para a maioria dos sorovares de *Salmonella* estão entre 0,2 e 6,5 minutos<sup>28</sup>. Determinados sorovares de *Salmonella enterica* são mais resistentes ao calor do que outros, sendo a *Salmonella* Senftenberg 775W a mais resistente<sup>25</sup>. No presente estudo, os resultados com o aquecimento a  $60^{\circ}\text{C}$  ( $P=0,187$ ) e  $70^{\circ}\text{C}$  ( $P=0,142$ ) demonstraram que nestas temperaturas não houve diferença significativa na resistência térmica entre as cepas de *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis*. Os valores  $D_{60}$  e  $D_{70}$ , necessários para reduzir a população, um ciclo da escala logarítmica, foram semelhantes para as três cepas.

Diferenças na resistência térmica entre *Salmonella* spp. e outros gêneros da Família *Enterobacteriaceae* são observadas.

**Tabela 1.** População inicial de *Salmonella* spp. e após os tratamentos térmicos a  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $70^{\circ}\text{C}$  e  $80^{\circ}\text{C}$

	População de <i>Salmonella</i> spp. ( $\log_{10}$ NMP/mL)			
	Inicial	$60^{\circ}\text{C}$	$70^{\circ}\text{C}$	$80^{\circ}\text{C}$
S. Enteritidis	$6,49 \pm 0,15^a$	$1,36 \pm 0,62$	$0,07 \pm 0,16$	— <sup>b</sup>
S. Panama	$6,43 \pm 0,35$	$1,80 \pm 0,33$	$0,87 \pm 0,80$	—
S. Infantis	$6,76 \pm 0,28$	$1,94 \pm 0,44$	$0,20 \pm 0,29$	—

<sup>a</sup>média  $\pm$  desvio padrão

<sup>b</sup>não houve recuperação de células viáveis ( $<0,3$  NMP/mL). Portanto, não foi possível expressar o resultado em  $\text{Log}_{10}$

*E. sakazakii* representa um dos microrganismos com maior termotolerância entre gêneros da Família *Enterobacteriaceae*, sendo encontrados valores  $D_{58}$  e  $D_{60}$  de 4,2 e 2,5 min., respectivamente, em fórmula infantil reconstituída<sup>29</sup>. Comparando os valores  $D_{60}$  obtidos no presente trabalho com os observados para *Enterobacter sakazakii*, verifica-se que os sorovares de *Salmonella* estudados apresentaram maior sensibilidade ao calor.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os tratamentos térmicos a 60 e 70°C/5 minutos não foram suficientes para eliminar toda população dos três sorovares de *Salmonella* ( $10^6$  NMP/mL) inoculada na fórmula infantil. Os níveis de patógenos encontrados em fórmulas lácteas em pó contaminadas, geralmente, são baixos<sup>13</sup>. Entretanto, o armazenamento inadequado do produto após reconstituição pode favorecer a multiplicação do agente. Uma população de *Salmonella*, em fórmula reconstituída mantida a 30°C por 24 horas, pode aumentar em até 7,5 ciclos logarítmicos<sup>15</sup>. Um aquecimento posterior poderá não ser suficiente para garantir a inocuidade do alimento, como observado no presente estudo.

Após o tratamento térmico a 80°C não houve recuperação de células viáveis de *Salmonella* spp. Entretanto, o uso de temperaturas elevadas para preparar as fórmulas lácteas não é recomendado, pois podem ocorrer alterações no conteúdo nutricional do produto, além do risco de queimaduras durante a manipulação e consumo<sup>14</sup>.

Considerando que as fórmulas lácteas são consumidas por crianças, particularmente, as hospitalizadas e prematuras ou que não podem ser amamentadas com leite materno, estes dados demonstram a importância dos cuidados nas etapas de preparo e manipulação destes alimentos, sendo consideradas pontos críticos de controle. O tratamento térmico pode não garantir a segurança do produto, principalmente, em fórmulas armazenadas inadequadamente e com elevada concentração de *Salmonella* spp.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos funcionários da Seção de Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz pela preparação dos meios utilizados neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Fantasia MR, Filetici E. *Salmonella* Enteritidis in Italia. *Int J Food Microbiol* 1994; 21: 7-13.
2. Notermans S, Borgdorff MA. Global Perspective of Foodborne Disease. *J Food Prot* 1997; 60 (11): 1395-9.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 sites, United States, 2004. Available from: [www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5414a2.htm](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5414a2.htm). Acesso: 10/11/2005.
4. Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE). Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. INFORME - NET DTA – Informações sobre Doenças Transmitidas por Água e Alimentos. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/dta\\_estat.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/dta_estat.htm). Acesso em: 01/11/2005.
5. Franco BDGM, Landgraf M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: Franco BDGM, Landgraf M, editores. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Ed Atheneu; 2002, p. 55-60.
6. Varnam AH, Evans MG. *Salmonella*. In: Varnam AH, editor. *Foodborne Pathogens*. St. Louis: Mosby Year Book; London: Wolfe, 1991; p. 51-85.
7. Jakabi M et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* spp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1999; 58(1): 47-51.
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Salmonella* serotype Tennessee in powdered milk products and infant formula – Canada and United States, 1993. Available from: [www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00021081.htm](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00021081.htm). Acesso: 10/11/2005.
9. Bornemann R, Zerr DM, Heath J, Koehler J, Grandjean M, Pallipamu R, Duchin J. An outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul in a children's hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23: 671-6.
10. Eurosurveillance. Preliminary report of an International outbreak of *Salmonella* Anatum infection linked to an infant formula milk, 1997. Available from: [www.eurosurveillance.org/em/v02n03/0203-224.asp](http://www.eurosurveillance.org/em/v02n03/0203-224.asp). Acesso: 10/11/2005.
11. Ruiz J, Nunez ML, Sempere MA, Diaz J, Gomez J. Systemic infections in three infants due to a lactose-fermenting strain of *Salmonella* Virchow. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 454-6.
12. Rowe B et al. *Salmonella* Ealing infections associated with consumption of infant dried milk. *Lancet* 1987; 2 (8564): 900-3.
13. Park et al. *Salmonella enterica* serovar London infections associated with consumption of infant formula. *Yonsei Med J* 2004; 45: 43-8.
14. World Health Organization. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. *Microbiological Risk Assessment Series* n° 6. Available from: [www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6/en/) Acesso: 10/11/2005.
15. Caric M. Concentrated and dried dairy products. In: *Dairy Science and Technology Handbook* vol.2. New York: VCH Publishers Inc; 1993.
16. Wu FM, Beuchat LR, Doyle MP, Mintz ED, Wells JG, Swaminathan B. Survival and growth of *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, and *Vibrio cholerae* O1 in reconstituted infant formula. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 782-6.
17. Salles RK, Goulart R. Diagnóstico das condições higiênicas-sanitárias e microbiológicas de lactários hospitalares. *Rev Saúde Pública* 1997; 31: 131-9.
18. Santos MIS, Tondo EC. Determinação de perigos e pontos críticos de controle para implantação de sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle em lactário. *Rev Nutr Campinas* 2000; 13: 211-22.
19. Edelson-Mammel SG, Buchanan RL. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *J Food Prot* 2004; 67: 60-3.
20. International Organization for Standardization (ISO). **Microbiology – General guidance for the detection of *Salmonella*. Intern. Org. for Standardization 6579, Geneva, Switzerland, 2002.**
21. Peeler JT, Houghtby GA, Rainosek AP. The most probable number technique. In: Vanderzant C, Splittstroesser DF, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* 3<sup>rd</sup>. Washington (DC): APHA; 1992, p. 105-20.
22. Pessoa GVA, Silva EAM. Meios de rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presumtiva de enterobactérias. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1972; 32: 97-100.
23. Forsythe SJ. Aspectos básicos. In: Forsythe SJ, editor. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre (RS): Artmed; 2002, p.28-30.
24. Quintavalla S, Larini S, Mutti P, Barbuti S. Evaluation of the thermal resistance of different *Salmonella* serotypes in pork meat containing curing additives. *Int J Food Microbiol* 2001; 67: 107-14.
25. MINITAB for windows [Minitab- Inc, USA.] Versão 13.31, 2000. CD-rom
26. Jay JM. Conservação de alimentos por altas temperaturas e características de microrganismos termofílicos. In: Jay JM, editor. *Microbiologia de Alimentos* 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed; 2005, p 365 – 85.
27. Mañas P, Pagán R, Sala FJ, Condón S. Low molecular weight milk whey components protect *Salmonella* Senftenberg 775W against heat by a mechanism involving divalent cations. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 871-7.
28. Robertos D. Bacteria of public health significance in meat microbiology. Brown, MH Ed. London and New York: Applied Science Publishers, 1982.
29. Nazarowec-White M, Farber JM. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Lett Appl Microbiol* 1997; 24: 9-13.