

Quantificação de *Staphylococcus aureus* e bactérias mesófilas aeróbias para avaliar higienização de equipamentos de ordenha

Staphylococcus aureus and Mesophilic Aerobic Bacteria Quantification in Hygienization Process of Milking Equipment

Daniela de Avila Silva Bohrz^{1,5}, Bruna Webber², Franciele Rampazzo Vancin³, Luciane Daroit⁴, Fernando Pilotto⁵, Luciana Ruschel dos Santos^{3,5} & Laura Beatriz Rodrigues^{3,5}

ABSTRACT

Background: Milk's composition is an excellent substrate for microorganism's multiplication. Presence of *Staphylococcus aureus* and aerobic mesophilic bacteria are one of the most common problems in dairy farms. On dairy industry's and milk farms Clean in Place (CIP) system hygienization are commonly used, then the cleaning occurs as a closed process, for better results sanitizers are applied, in order to obtain a safety food. This project aim to evaluate *Staphylococcus aureus* and aerobic mesophilic bacteria reduction after two milking hygienization process.

Materials, Methods & Results: This research was done on a Rio Grande do Sul North Milk farm, with mechanized milking and Clean in Place system for cleaning. For liners and CIP tubes hygienization commercial products as Sodium Hypochlorite 3% and phosphoric acid 11.3% are used for detergency, and peracetic acid 5% for sanitization. Milk bunk tank are hygienized with sodium hypochlorite 3.8% alcalin detergent. After hygienization steps liners, CIP's water process, bulk milk tank and milk set were collected. At process 1, liners and CIP water were collected after milking, detergency and sanitization that occurred immediately at the detergency's finish, while process 2 the sanitization was realized 8 h after detergency, before following milking. Cooling milk bulk tank was collected before and after detergency, and milk set after milkings. Conventional microbiology were used to count and results in log₁₀ UFC.cm⁻². In CIP water's after process 1 was 3.81 log₁₀ reduction to aerobic mesophilic bacteria ($P > 0.05$) and reducing 4.51 log₁₀ ($P = 0.03$). Meanwhile there was no significant reduction for mesophilic aerobic bacteria and *S. aureus* on the others samples (liners, bulk milk tank and milk set).

Discussion: This results show the maintenance of milking machine contamination, and that even bacterial load reduced among hygienization steps this was not significant, suggesting that deteriorate and pathogenic microorganisms can remain on milk produced. Highlights are teat taps of milking machine as the major cause of contamination among cows. The results are worrying because *Staphylococcus aureus* contamination, once this bacteria causes alimentar diseases, even after hygienization process, which can damage public health that can reflect milk chain economically. Since amount of this microorganism found in milk is already sufficient to synthesize enterotoxins. In addition, resistance to disinfectants is another concern, as it may result in resistance to antimicrobial agents. So reduction of bacteria level among cleaning steps there was no significance, once the products and equipments on dairy and farms act as a constant elimination point of deteriorate and pathogenic microorganisms for the final product, milk. The results obtained aim to aprimorate. hygienization processes on milk chain, in order to obtain a hygienic sanitary good product.

Keywords: milking, milk, contamination, bacteria, *Staphylococcus aureus*.

Descritores: ordenha, leite, contaminação, bactéria, *Staphylococcus aureus*.

DOI: 10.22456/1679-9216.97777

Received: 4 June 2019

Accepted: 10 October 2019

Published: 14 November 2019

¹Departamento de Agricultura, Pecuária e Comércio, Prefeitura Municipal de Quinze de Novembro, RS, Brazil. ²Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS. ³Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos; ⁴Faculdade de Matemática & ⁵Programa de Pós-graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS. CORRESPONDENCE: D.A.S. Bohrz [danibohrz@hotmail.com]. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) - UPF. BR 285. CEP 99052-900 Passo Fundo, RS, Brazil.

INTRODUÇÃO

A composição do leite o torna um excelente substrato para a multiplicação de microrganismos [5]. A presença de *Staphylococcus aureus* e de bactérias mesófilas aeróbias no leite está entre os problemas nas propriedades leiteiras.

S. aureus é o principal agente etiológico de mastite em bovinos [20], sendo o microrganismo mais isolado de leite cru [22]. *S. aureus* é onipresente podendo ser isolado na pele de animais sadios, pele humana, equipamentos e leite [16].

Contagens altas de bactérias mesófilas aeróbias indicam uma matéria-prima contaminada. Essa contaminação se dá devido a falhas nos processos de higienização das tetas antes da ordenha e a falhas nos sistemas de limpeza e sanitização dos equipamentos e utensílios que entram em contato com o leite [5].

Na higienização na indústria de laticínios e nas propriedades leiteiras comumente utiliza-se o sistema Clean in Place (CIP), onde a limpeza ocorre em processo fechado, automático, sem desmontagem, utilizando produtos para a detergência e sanitização [2]. Embora os detergentes diminuam a carga bacteriana das superfícies, o objetivo do seu uso é a remoção de resíduos orgânicos e minerais [11]. Para melhorar esse controle o sistema CIP pode ser complementado com sanitizantes, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária [2].

A contaminação do leite pode ocorrer por via endógena (animais enfermos) ou exógena (após saída do úbere), a saúde da glândula mamária, o ambiente de alojamento, a higiene da ordenha e equipamentos afetam a qualidade do leite [21]. O objetivo foi verificar as condições higiênico-sanitárias de equipamentos de ordenha através da quantificação de *S. aureus* e bactérias mesófilas aeróbias.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em uma propriedade leiteira no norte do Rio Grande do Sul, com ordenha mecanizada e processo de limpeza com sistema automatizado Clean in Place (CIP). Foram acompanhados dois processos de ordenha para verificar a eficácia da higienização dos equipamentos, amostrando swabs de superfícies de teteiras de silicone e do tanque de refrigeração de aço inoxidável AISI 304, água do CIP e leite do conjunto, todos coletados com três repetições para cada ponto e etapa analisados.

Os procedimentos seguiram a recomendação do fabricante dos produtos químicos quanto ao tempo de exposição e concentração utilizados. Entretanto, foram testados diferentes tempos entre a etapa de detergência e de sanitização. Na ordenha 1 a sanitização foi realizada imediatamente ao fim da detergência e, na ordenha 2, foi seguida a recomendação do fabricante, com a sanitização sendo feita 8 h depois da detergência, antes da ordenha subsequente. Para higienização das teteiras e tubulações pelo sistema automatizado CIP foram utilizados produtos comerciais à base de hipoclorito de sódio a 3.8% e de ácido fosfórico a 11.3% na etapa de detergência; e ácido peracético a 5% para sanitização. O tanque de refrigeração foi higienizado de modo automatizado com detergente alcalino a base de hipoclorito de sódio a 3.8%.

As superfícies das teteiras e do tanque de refrigeração foram coletados com swab em uma área de 4 cm², delimitada por molde estéril, transferidos para tubos com 1 mL de solução tampão-neutralizante¹ estéril. A água residual do CIP foi coletada em alíquotas de 100 mL, em frascos estéreis com neutralizantes. O leite do conjunto foi coletado após o término das ordenhas, em frascos estéreis, em alíquotas de 100 mL.

As amostras das teteiras (Tet) e da água do CIP (Cip) foram coletadas após a ordenha (O), com resíduos de leite; após a detergência (D); e após as sanitizações (S), sendo que na ordenha 1 (O1) a sanitização foi realizada imediatamente ao fim da detergência e, na ordenha 2 (O2), a sanitização foi feita 8 h depois da detergência, antes (A) da ordenha subsequente. A água do CIP amostrada após as ordenhas era coletada após a primeira passagem pelos equipamentos, assim como a água após 8 horas do equipamento sem uso; nos momentos após detergências e sanitizações eram provenientes do último enxágue dos equipamentos. O tanque de refrigeração (Tq) foi coletado antes da higienização, sujo de leite; e após o processo de detergência. O leite do conjunto (L) foi coletado após o término das duas ordenhas. As coletas foram realizadas nas etapas e pontos descritos na Figura 1.

A contagem de *S. aureus* baseou-se na metodologia descrita por Evancho *et al.* [8], através da inoculação de 0.1 mL de cada diluição em placas de Agar Baird-Parker². Após o inóculo ser homogeneizado com uma alça de Drigalski, as placas foram incubadas invertidas a 36 ± 1°C. A leitura foi realizada após 48 h

de incubação. A confirmação das colônias de *S. aureus* se deu através de microscopia, coloração de Gram e provas bioquímicas: catalase, coagulase, DNase, teste de Voges-Proskauer. Os resultados foram expressos como \log_{10} UFC.cm⁻².

A contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios foi baseada em Evancho *et al.* [8], onde inóculos de 0.1 mL foram depositados em placas de

Petri estéreis com ágar Padrão de Contagem (PCA)³. As placas tiveram o inóculo homogeneizado com uma alça de Drigalski, e incubadas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A leitura foi realizada após 48 h de incubação, e os resultados expressos \log_{10} UFC.cm⁻².

Os resultados obtidos foram analisados por meio da análise de variância. A comparação das médias foi realizada com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

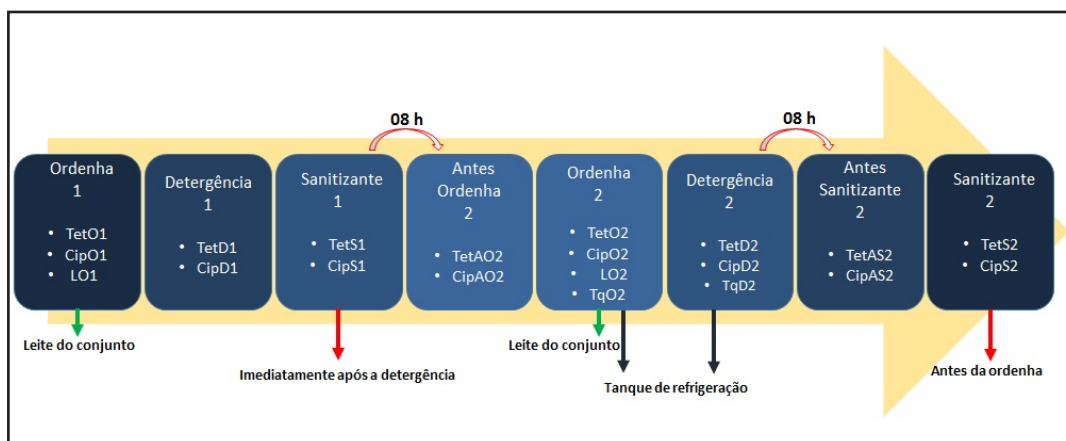


Figura 1. Pontos de coleta para a quantificação de bactérias mesófilas aeróbias e *Staphylococcus aureus*. TetO1: teteiras com resíduos de leite da ordenha 1; CipO1: água primeiro enxágue do CIP após ordenha 1; LO1: leite do conjunto - ordenha 1; TetD1: teteiras após a detergência da ordenha 1; CipD1: água do CIP após detergência - ordenha 1; TetS1: teteiras, após sanitizante e depois da detergência ordenha 1; CipS1: água do CIP após sanitizante e depois da detergência - ordenha 1; TetAO2: teteiras após sanitizante 1, sem uso por 8 h, antes da ordenha 2; TetO2: teteiras com resíduos de leite da ordenha 2. CIPO2: água do primeiro enxágue do CIP, após ordenha 2; LO2: leite do conjunto da ordenha 2; TqO2: tanque com resíduos após retirada do leite do conjunto da ordenha 2; TetD2: teteiras após a detergência da ordenha 2; CipD2: água do CIP após detergência da ordenha 2; TqD2: tanque após detergência da ordenha 2; TetAS2: teteiras após detergência 2, sem uso por 8 h, antes do sanitizante 2 e da próxima ordenha; CipAS2: água do CIP após detergência 2, sem uso por 8 h, antes do sanitizante 2 e da próxima ordenha; TetS2: teteiras, após o sanitizante, 8 h depois da detergência da ordenha 2; CipS2: água do CIP, após sanitizante, 8 h depois da detergência da ordenha 2.

RESULTADOS

Ao avaliar os resultados obtidos nas teteiras, tanto para bactérias mesófilas aeróbias quanto para *Staphylococcus aureus*, não houve diferença estatística entre os pontos de coleta na ANOVA ($P = 0.05$), conforme Tabela 1. As teteiras com resíduos de leite da ordenha 1 (O1) e da 2 (O2) apresentaram, respectivamente, médias de 2.60 e 1.46 \log_{10} UFC.cm⁻² para *S. aureus*. Após o processo de detergência 1 (D1) e detergência 2 (D2) esses valores diminuíram para 0.43 \log_{10} UFC.cm⁻² e 0.0 \log_{10} UFC.cm⁻², porém, essas reduções não foram significativas. A utilização do sanitizante nas teteiras também não demonstrou ser eficiente. Após a sanitização 1 (S1) houve um aumento no número de *S. aureus* para 1.19 \log_{10} UFC.cm⁻². Ao avaliar a segunda ordenha, o ponto após a detergência 2, com as teteiras sem uso por 8 h, coletado antes do sanitizante 2 (AS2) teve um aumento de *S. aureus* para 0.88 \log_{10} UFC.cm⁻².

Depois do sanitizante 2 (S2), realizado antes da ordenha subsequente, houve uma redução da contaminação para 0.33 \log_{10} UFC.cm⁻². Apesar de haver redução nos níveis de *S. aureus* em relação à contaminação encontrada nas teteiras sujas de leite, não houve diferença estatística significativa por nenhum processo de higienização, nem detergência nem sanitização.

DISCUSSÃO

A utilização dos detergentes e sanitizantes nas teteiras também não foram consideradas eficazes para bactérias mesófilas aeróbias, pois não diminuiu a carga bacteriana presente após a ordenha. O uso do sanitizante (S1) logo após o uso dos detergentes alcalino e ácido na ordenha 1, ou a sanitização antes de um novo turno de ordenha, conforme a recomendação do fabricante (S2), não apresentaram diferença entre elas, e neste último houve um aumento da contagem após a sanitização.

Tabela 1. Contagem de bactérias mesófilas aeróbias e *Staphylococcus aureus* em teteiras e água do CIP em sala de ordenha mecanizada. Média das repetições.

Pontos de coleta	Mesófilos aeróbios (log ¹⁰ UFC.cm ⁻²)		<i>Staphylococcus aureus</i> (log ¹⁰ UFC.cm ⁻²)	
	Teteiras	CIP	Teteiras	CIP
O1	4.42 ± 2.59 a	7.78 ± 1.43 ab	2.60 ± 2.51 a	2.63 ± 2.51 a
D1	3.38 ± 2.91 a	3.97 ± 1.53 b	0.43 ± 0.75 a	0.00 ± 0.00 a
S1	3.37 ± 2.91 a	5.79 ± 0.88 ab	1.19 ± 2.07 a	0.67 ± 1.15 a
AO2	1.56 ± 2.28 a	5.63 ± 1.53 ab	0.63 ± 1.09 a	1.40 ± 1.59 a
O2	5.13 ± 1.91 a	5.73 ± 1.69 ab	1.46 ± 2.53 a	0.67 ± 1.15 a
D2	2.80 ± 3.38 a	8.30 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
AS2	3.95 ± 2.90 a	5.53 ± 1.26 ab	0.88 ± 1.53 a	0.36 ± 0.62 a
S2	4.03 ± 2.51 a	3.79 ± 2.31 b	0.33 ± 0.58 a	0.00 ± 0.00 a

As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$). O1: ordenha 1; D1: imediatamente após a detergência da ordenha 1; S1: após o sanitizante e imediatamente depois da detergência da ordenha 1; AO2: após o sanitizante 1, sem uso por 8 horas, antes da ordenha 2; O2: resíduos de leite da ordenha 2; D2: após a detergência da ordenha 2; AS2: após a detergência 2, sem uso por 8 horas, antes do sanitizante 2 e da próxima ordenha; S2: após o sanitizante, 8 horas depois da detergência da ordenha 2.

As teteiras da ordenhadeira mecânica são consideradas como a maior causa de contaminação entre as vacas [10]. Um trabalho obteve a média de contagem de bactérias mesófilas aeróbias em teteiras após ordenha de 12.81 UFC.cm⁻² (1.11 log₁₀ UFC.cm⁻²) e, após a higienização, de 1.09 UFC.cm⁻² (0.04 log₁₀ UFC.cm⁻²) [14]. A higienização adequada reduz a contagem bacteriana das superfícies dos equipamentos de ordenha. Corroboram com esta afirmação resultados encontrados ao avaliar a eficácia dos procedimentos de higienização dos equipamentos de ordenha por Cavalcanti [6], que obteve como média de contagem bacteriana das teteiras higienizadas o valor de 1.8 UFC.cm⁻² (0.25 log₁₀ UFC.cm⁻²) e Costa [7], que testou equipamentos de ordenha manual e observou redução de 90% da contaminação. Porém, no presente estudo, a redução em teteiras, para bactérias mesófilas aeróbias, após a higienização com detergentes e sanitizantes, foi de apenas 23.76% após a ordenha 1 (O1) e de 21.45% para a ordenha 2 (O2).

Em relação aos resultados obtidos a partir da água coletada do processo CIP para bactérias mesófilas aeróbias, na ordenha 1, o uso da detergência (D1) apresentou 3.97 log₁₀ UFC.cm⁻², uma redução de 3.81 log₁₀ após a ordenha (O1), com diferença significativa. Mas, após o uso do sanitizante, houve um aumento na contagem de bactérias (5.79 log₁₀ UFC.cm⁻²), conforme descrito na Tabela 1. Ao comparar a carga bacteriana após a detergência da ordenha 2 (D2: 8.30 log₁₀ UFC.cm⁻²) com a obtida após o uso do sanitizante, 8 horas

depois da detergência da ordenha 2 (S2: 3.79 log₁₀ UFC.cm⁻²), houve queda significativa ($P = 0.030$), reduzindo 4.51 log₁₀. De acordo com a norma EN 13697 de testes de superfícies da União Europeia, a higienização deve realizar uma redução de no mínimo 4 log [15]. Deste modo, esta etapa foi a única que pode ser considerada eficaz. Para *S. aureus* a detergência D1 e D2, e a sanitização S2, diminuíram a contagem bacteriana em relação ao detectado após ordenha, com resíduos de leite. Entretanto, não houve diferença estatística entre os pontos. O sistema CIP, mesmo com as possíveis deficiências e resistências aos desinfetantes, é comumente utilizado para garantir segurança alimentar e recuperação da planta industrial [1]. A resistência aos desinfetantes é preocupante, visto que pode resultar em resistência a agentes antimicrobianos, a resistência cruzada pode ocorrer se dois agentes antibacterianos usarem o mesmo mecanismo de ação ou de resistência [12].

Os valores encontrados na superfície do tanque de refrigeração após a ordenha (O2), ainda com resíduos de leite, foram de 4.5 ± 2.28 log₁₀ UFC.cm⁻² de bactérias mesófilas aeróbias e 2.8 ± 0.73 log₁₀ UFC.cm⁻² de *S. aureus*. Após a detergência D2, obteve-se 4.7 ± 3.46 log₁₀ UFC.cm⁻² de bactérias mesófilas aeróbias e 2.2 ± 2.75 log₁₀ UFC.cm⁻² de *S. aureus*. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos antes e após a higienização, com aumento da contagem de mesófilos após a detergência. Destaca-se que os valores superiores a 2.0 UFC.cm⁻² (0.3 log₁₀ UFC.cm⁻²) indicam higiene

inadequada das superfícies que entram em contato com alimentos, segundo a American Public Health Association (APHA) [8]. Assim, os resultados obtidos demonstram que o processo de limpeza automatizado no tanque de refrigeração da propriedade estudada foi ineficaz.

O leite do conjunto apresentou 2.34×10^5 UFC.mL⁻¹ ($5.37 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹) no final da ordenha 1 (O1) e 1.5×10^5 UFC.mL⁻¹ ($5.17 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹) no final da ordenha 2 (O2) para bactérias mesófilas aeróbias, e 1.1×10^3 UFC.mL⁻¹ ($3.04 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹) e 1.3×10^3 UFC.mL⁻¹ ($3.11 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹) para *S. aureus* nas ordenhas 1 e 2, respectivamente. Os valores encontrados neste estudo para mesófilos aeróbios no leite do conjunto não ultrapassaram as recomendações da IN 62 [4] para o ano de 2015, que é de 3.0×10^5 UFC.mL⁻¹ ($5.47 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹). Porém, ao considerarmos o valor estabelecido pela IN 62 [4], a partir de 2016, para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, estariam acima do limite máximo, que será de 1.0×10^5 UFC.mL⁻¹ ($5 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹) para contagem padrão em placas (CPP), ou seja, quantificação de bactérias mesófilas aeróbias. Valores inferiores ao estabelecido pela legislação também foram encontrados por Reche *et al.* [19] que, ao avaliar a contagem bacteriana total do leite do conjunto de 19 tanques refrigerados de expansão direta, encontraram valores médios de $4.96 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹. A literatura registra que 95% dos problemas com altas contagens de microrganismos mesófilos aeróbios são originários de insuficiências na higiene da ordenha, como lavagem e sanitização inadequada de utensílios e sistema de ordenha deficitária, os quais podem estar associados a mau resfriamento do leite, mas que raramente a vaca é fonte de problema [13].

Garcia *et al.* [9], em experimento com leite do conjunto orgânico cru, obtiveram, em média, $5.4 \log^{10}$

UFC.mL⁻¹ de aeróbios mesófilos e $2.95 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹ de *S. aureus*. Ao quantificar *S. aureus* de leite cru coletados de tanques de refrigeração, Picoli *et al.* [18] obteve a média de $3.68 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹, a partir de 274 amostras analisadas e, Picoli *et al.* [17], encontraram média de $3.93 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹, na região de Porto Alegre, RS. Os valores para *S. aureus* se assemelham ao encontrado no presente experimento, sendo inferiores a 10^5 UFC.mL⁻¹ ($5 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹), que segundo Bergdoll [3], a partir desse valor o leite já contém microrganismos em quantidade suficiente para sintetizar enterotoxinas.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados são preocupantes visto que há contaminação presente, inclusive por bactérias do gênero *S. aureus*, causadora de intoxicações alimentar, mesmo após o processo de higienização CIP. A diminuição da carga bacteriana entre as etapas de limpeza não foi considerada significativa, podendo os equipamentos, atuarem como um ponto de eliminação constante de microrganismos deteriorantes e patogênicos ao produto final obtido, o leite. É necessário aprimorar os métodos de higienização na cadeia leiteira a fim de obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária e valorização do produto no mercado interno.

MANUFACTURERS

¹COPAN Innovating Together. Brescia, Italy.

²Laborclin Produtos para Laboratório Ltda. Pinhais, PR, Brazil.

³HiMedia Laboratories. Mumbai, India.

Acknowledgments. A Capes/Prosop/UPF por apoiarem esse estudo através da bolsa de estudos.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Alvarez N., Daufin G. & Gésan-Guiziu G. 2010. Recommendations for rationalizing cleaning-in-place in the dairy industry: Case study of an ultra-high temperature heat exchanger. *Journal of Dairy Science*. 93(2): 808-821. doi:10.3168/jds.2009-2760
- 2 Andrade N.J. 2008. *Higienização na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos*. São Paulo: Varela. 412p.
- 3 Bergdoll M.S. 1990. Staphylococcal food poisoning. In: Cliver D.O. (Ed). *Foodborne diseases*. London: Academic, pp.87-106.
- 4 Brasil. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 62. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Seção 1, Brasília, 29 de dezembro de 2011.

- 5 Brito M.A.V.P., Arcuri E.F. & Brito J.R.F. 2000. Testando a qualidade do leite. In: Durães M.C., Martins C.E., Deresz F., Brito J.R.F., Freitas A.F., Portugal J.A.B. & Costa C.N. (Eds). *Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira. Anais Minas Leite*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, pp.83-94.
- 6 Cavalcanti E.R.C. 2005. Construção do conhecimento sobre o potencial de contaminação em ordenhadeira mecânicas após higienização. 67f. Rio de Janeiro, RJ. Dissertação (Mestrado em Educação Agrícola) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- 7 Costa F.F. 2006. Interferência de práticas de manejo na qualidade microbiológica do leite produzido em propriedades rurais familiares. 80f. Jaboticabal, SP. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- 8 Evancho G.M., Sveum W.H., Moberg L.J. & Frank J.F. 2001. Microbiological Monitoring of the Food-Processing Environment. In: Downes F.P. & Ito K. (Eds). *Compendium of Methods for the Microbial Examination of Foods*. Washington DC: American Public Health Association, pp.25-35.
- 9 Garcia M.E.T.A., Couto E.P & Ferreira M.A. 2014. Leite orgânico produzido no Distrito Federal: avaliação da qualidade físico-química e microbiológica. *ASA - Atas de saúde ambiental*. 2(3): 16-24.
- 10 Gleeson D., O'Brien B., Flynn J., O'Callaghan E. & Galli F. 2009. Effect of pre-milking teat preparation procedures on the microbial count on teats prior to cluster application. *Irish Veterinary Journal*. 62(7): 461. doi:10.1186/2046-0481-62-7-461
- 11 Hoffmann F.L., Coelho A.R., Mansor A.P. & Vinturim T.M. 2002. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de dois agentes sanitizantes de uso industrial. *Higiene Alimentar*. 16(94): 62-67.
- 12 Langsrud S., Sidhu M.S., Heir E. & Holck A.L. 2003. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 51(4): 283-290. doi:10.1016/s0964-8305(03)00039-8
- 13 Laranja da Fonseca L.F. & Santos M.V. 2000. *Qualidade do leite e controle de mastite*. Cap. 14. São Paulo: Ed. Lemos, pp.151-161.
- 14 Miguel P.R.R., Pozza M.S.S., Caron L.F., Zambom M.A. & Pozza P.C. 2012. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. *Semina: Ciências Agrárias*. 33(1): 403-416. doi:10.5433/1679-0359.2012v33n1p403
- 15 Moretro T., Vestby L.K., Nesse L.L., Storheim S.E., Kotlarz K. & Langsrud S. 2009. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*. 106(3): 1005-1012. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04067.x
- 16 Pengov A. 2006. *Staphylococcus aureus* - do we really have to live with it? *Slov Vet Res*. 43(1): 41-46.
- 17 Picoli S.U., Bessa M.C., Castagna S.M.F., Gottardi C.P.T., Schmidt V. & Cardoso M. 2006. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26(1): 64-69. doi:10.1590/s0101-20612006000100011
- 18 Picoli T., Zani J.L., Bandeira F.S., Büttow V.F., Ribeiro M.E.R., Vargas G.A., Hübner S.O., Lima M., Meireles M.C.A. & Fischer G. 2014. Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de micro-organismos em leite cru. *Semina: Ciências Agrárias*. 35(4): 2471-2480. doi:10.5433/1679-0359.2014v35n4Suplp2471
- 19 Reche N.L.M., Thaler Neto A., D'Ovideo L., Felipus N.C., Pereira L.C., Cardozo L.L. & Picinin L.C.A. 2015. Multiplicação microbiana no leite cru armazenado em tanques de expansão direta. *Ciência Rural*. 45(5): 828-834. doi:10.1590/0103-8478cr20140542
- 20 Sabelot M.A., dos Santos Pozza M.S., da Silva L.S., Zambom M.A., Pozza P.C. & Eckstein I.I. 2014. Isolamento de bactérias causadoras de mastite subclínica e correlação entre qualidade físico-química do leite e contagem de células somáticas. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*. 1(2): 99-106.
- 21 Tronco V.M. 2010. *Manual para Inspeção de Qualidade do Leite*. Santa Maria: Ed. UFSM, 203p.
- 22 Zecchoni A. & Hahn G. 2000. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. *Bulletin IDF*. 345: 15-18.