

# CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE LEITE PROVENIENTE DE VACAS NATURALMENTE INFECTADAS POR *Streptococcus* spp

Acacia Orieth Elias  
Cassiano Victoria  
Aristeu Vieira da Silva  
Helio Langoni

ELIAS<sup>1</sup>, A.O.; VICTORIA<sup>1</sup>, C.; DA SILVA<sup>2</sup>, A.V.; LANGONI<sup>3</sup>, H. Características físico-químicas e contagem de células somáticas de leite proveniente de vacas naturalmente infectadas por *Streptococcus* spp. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 8(2): p. 165-170, 2005.

**RESUMO:** Foram estudadas 1051 vacas da raça Holandesa de seis propriedades leiteiras do estado de São Paulo. As amostras de leite foram cultivadas em ágar sangue ovino 8% e ágar MacConkey, sob aerofilia, por até 96 horas na intenção de isolar *Streptococcus* spp em estado puro. Confirmada a presença do agente, bem como a ausência de outros microrganismos aeróbicos nas amostras, realizaram-se as seguintes provas: densidade, gordura, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), acidez (°D), crioscopia, prova quantitativa para proteína, prova quantitativa para cloretos, contagem de células somáticas (CCS), bem como a classificação taxonômica do agente. A análise estatística dos resultados revelou que os *Streptococcus* spp promoveu alterações significativas no que diz respeito aos parâmetros densidade, gordura, teor de cloretos e contagem de células somáticas. Os resultados referentes aos padrões de proteína, EST, ESD e acidez não apresentam alterações estatisticamente significativas entre o grupo de amostras positivas para o agente e o grupo negativo. Com base nas alterações observadas conclui-se que o *Streptococcus* spp, como agente etiológico das mastites, causa perdas econômicas significativas aos produtores, indústria e consumidores da cadeia do leite.

**PALAVRAS-CHAVE:** mastites, *Streptococcus* spp, alterações físico-químicas, CCS

## PHYSIC-CHEMICAL CHARACTERISTICS AND SOMATIC CELL COUNT IN BOVINE MILK NATURALLY INFECTED BY *Streptococcus* spp

ELIAS<sup>1</sup>, A.O.; VICTORIA<sup>1</sup>, C.; DA SILVA<sup>2</sup>, A.V.; LANGONI<sup>3</sup>, H. Physic-chemical characteristics and somatic cell count in bovine milk naturally infected by *Streptococcus* spp. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 8(2): p. 165-170, 2005.

**ABSTRACT:** 1051 Holstein cows from six dairy farms in Sao Paulo state - Brazil were studied. Milk samples were cultivated in sheep blood agar and 8% MacConkey agar, under aerobic conditions for 96 hours in order to isolate *Streptococcus* spp in pure state. All the positive samples and the control group of negative ones were submitted to the following tests: density, fatness, total dry extract (EST), fatless dry extract (ESD), acidity (°D), cryoscopy, quantitative protein proof, quantitative chlorine proof, somatic cell count (SCC) as well as the taxonomic classification of the agent. The statistical analysis showed that *Streptococcus* spp was responsible for significant alterations in the parameters of density, fatness, chlorine and CCS. The results from the standards of protein, EST, ESD and acidity didn't present alterations statistically significant among the positive samples for the agent and the negative group. Based on the observed alterations it was concluded that *Streptococcus* spp, as etiologic agent of mastitis, can cause significant economic losses to producers, industry and milk consumers.

**KEY WORDS:** mastitis, *Streptococcus* spp, physic-chemical alterations, SCC

## CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS Y CÓMPUTO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE LECHE DE VACAS NATURALMENTE INFECTADAS POR *Streptococcus* spp

ELIAS<sup>1</sup>, A.O.; VICTORIA<sup>1</sup>, C.; DA SILVA<sup>2</sup>, A.V.; LANGONI<sup>3</sup>, H. Características físico-químicas y cómputo de células somáticas de leche de vacas naturalmente infectadas por *Streptococcus* spp. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 8(2): p. 165-170, 2005.

**RESUMEN:** Fueron estudiadas 1051 vacas de la raza Holandesa de seis propiedades de leche del Estado de São Paulo. Las muestras de leche fueron cultivadas en agar sangre de ovino 8% y agar MacConkey, bajo aerofilia, hasta 96 horas para intentar aislar *Streptococcus* spp en estado puro. Confirmada la presencia del agente, así como la ausencia de otros microorganismos aeróbicos en las muestras, fueron realizadas las siguientes pruebas: densidad, grasa, extracto seco total

<sup>1</sup> Pós-graduandos – Doutorado – DHVSP, FMVZ, UNESP, Botucatu – SP.

<sup>2</sup> Professor Assistente Doutor – UNIPAR, Umuarama – PR

<sup>3</sup> Coordenador do NUPEMAS – Núcleo de Pesquisa em Mastites - Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, Brasil. Distrito de Rubião Júnior, s/n – CEP 18618-000 – e-mail: [hlangoni@fmvz.unesp.br](mailto:hlangoni@fmvz.unesp.br)

(EST), extracto seco sin grasa (ESD), acidez (D), crioscopia, prueba cuantitativa para las proteínas prueba cuantitativa para los cloretos, cómputo de las células somáticas (CCS), así como la clasificación taxonómica del agente. El análisis estadístico de los resultados reveló que los *Streptococcus* spp promovieron alteraciones significativas para los parámetros densidad, grasa, tenor de cloretos y cómputo de células somáticas. Los resultados referentes a los moldes de proteínas, EST, ESD y acidez no presentaron alteraciones estadísticamente significativas entre el grupo de muestras positivas para el agente y el grupo negativo. Basándose en las alteraciones observadas se conclui que el *Streptococcus* spp, como agente etiológico de la infección, causa pierdas económicas significativas a los productores, a la industria y a los consumidores de la leche.

**PALABRAS-CLAVES:** infección, *Streptococcus* spp, alteraciones físico-químicas, CCS

### Introdução

A mastite caracteriza-se por alterações físicas, químicas e bacteriológicas no leite, e patológicas do tecido glandular mamário (LANGONI & DOMINGUES, 1998). O processo inflamatório da glândula mamária pode ser de evolução aguda a crônica, apresenta-se nas formas subclínica e clínica. Epidemiologicamente, a forma subclínica é mais importante, pois pode permanecer silenciosa no rebanho, sem alterações macroscópicas do úbere e secreção (BLOOD & RADOSTITIS, 1991). Os seus efeitos na composição do leite são significativos, embora o leite possa parecer normal ao exame visual, ele apresenta a CCS elevada. A lactose pode estar reduzida em 5 a 20%, enquanto que a principal proteína do leite, a caseína, pode estar diminuída em 6 a 18%, e os sólidos totais têm um decréscimo de 3 a 12%. O conteúdo em minerais também se encontra alterado, já que minerais como cálcio, fósforo e potássio estão diminuídos, enquanto o sódio e cloro então aumentados (PHILPOT, 1998).

As bactérias do gênero *Streptococcus* representam um grupo diversificado de microrganismos que se adaptaram a um habitat limitado, geralmente como parasitas de superfícies, pele e mucosas do homem e dos animais. A sobrevivência desses patógenos depende de estratégias de escape dos mecanismos de defesa dos hospedeiros. Associada a em evolução está a aquisição de uma variedade de fatores de virulência que favorecem a persistência extracelular a despeito de um infiltrado massivo de células de defesa (OLIVER *et al.*, 1998).

*Streptococcus agalactiae* é um microrganismo contagioso e obrigatório da glândula mamária bovina (McDONALD, 1977), apresenta a habilidade de se aderir ao tecido mamário, e as condições específicas do úbere são necessárias para o crescimento bacteriano (WAGNER & DUNNY, 1984). Geralmente causa infecções de baixa persistência e apresenta uma baixa taxa de cura espontânea (FARNSWORTH, 1987). Os animais infectados, porém não detectados, funcionam como reservatório do agente (VILLANUEVA *et al.*, 1991). Como é um patógeno intramamário obrigatório, o úbere é considerado como a única fonte do microrganismo e, devido à alta contagiosidade, um rebanho infectado normalmente apresenta alta taxa de prevalência (GONZALEZ *et al.*, 1986).

As mastites causadas por microrganismos ambientais, embora menos comuns, também são importantes. Em contraste com os microrganismos contagiosos, que têm como reservatório o próprio úbere, o contágio e a transmissão não se limitam somente aos processos de ordenha e sim a qualquer período da vida do animal, como o período entre as ordenhas e o período entre as lactações (COSTA *et al.*,

1998). Segundo SMITH & HOGAN (1993), outras espécies de *Streptococcus* spp, que não *S. agalactiae*, são os patógenos primários mais implicados nas mastites ambientais.

Os objetivos do presente trabalho foram verificar as alterações na CCS e nos parâmetros físico-químicos do leite de vacas naturalmente infectadas por microrganismos do gênero *Streptococcus*, assim como estudar a correlação entre as alterações físico-químicas e a CCS.

### Material e Métodos

Em municípios do Estado de São Paulo, foram estudados seis rebanhos de bovinos leiteiros da raça Holandesa Preta e Branca, explorados com manejo de ordenha mecânica, totalizando 1051 vacas em lactação. Dentre as 4204 glândulas mamárias estudadas, 685 (16,3%) apresentaram grau de reatividade igual ou superior a uma cruz ao teste do *California Mastitis Test* (CMT). O procedimento de colheita de amostras de 20 ml de leite nas primeiras visitas às propriedades, em frasco de vidro estéril, de cada glândula mamária positiva ao CMT para a realização do cultivo microbiológico em placas, utilizando meio de ágar sangue ovino a 8% assim como em agar McConkey com incubação por até 96 horas a 37°C, observando o crescimento microbiano a cada 24 horas. A partir do isolamento em estado puro do *Streptococcus* spp, caracterizado de acordo com suas características morfológicas e tintoriais, foram identificados os animais correspondentes e realizada uma segunda visita às mesmas propriedades. Foram colhidas novamente amostras de leite das glândulas mamárias positivas para o agente, bem como das negativas, que foram submetidas a novo cultivo microbiológico sob o mesmo padrão de procedimento, para a confirmação do isolamento do agente em estado puro e da negatividade microbiológica das glândulas mamárias de controle. A identificação das espécies de *Streptococcus* e a classificação taxonômica, segundo QUIN *et al.* (1994), foram realizadas, utilizando as provas da hidrólise da esculina e do hipurato de sódio, teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson) e de carboidratos e álcoois, representados pela inulina, lactose, manitol, rafinose, salicina, sorbitol e trealose, e o crescimento em NaCl a 6,5%.

Foram colhidos ainda, tanto das glândulas mamárias microbiologicamente positivas ao agente, bem como das negativas, 250ml de leite em frascos de vidro estéreis, para a realização das análises físico-químicas, incluindo a acidez (°Dornic), cloretos, densidade, gordura, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), crioscopia e teor de proteínas (BRASIL, 1981). Da mesma forma, foram colhidos em frascos plásticos, contendo duas pastilhas do conservante bronopol (2-bromo-2nitropropano-1, 3-diol) 60mL de leite dos quartos positivos e negativos individualmente e amostras compostas de todas as glândulas mamárias dos animais, com a finalidade da

contagem eletrônica de células somáticas, utilizando o aparelho Somacount 300 (Bentley Instruments®). O acondicionamento para transporte das amostras para as análises microbiológicas e físico-químicas foi feito em caixas isotérmicas, mantidas sob temperatura de refrigeração com gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia e Citologia Láctea do Núcleo de Pesquisa em Mastites – NUPEMAS – FMVZ – Botucatu, para processamento, de acordo com os tipos de análises a ser realizadas.

Todas as amostras foram colhidas durante a primeira ordenha do dia, após limpeza das tetas com água corrente, higienização do óstio da teta com álcool iodado a 5% e do descarte dos três primeiros jatos de leite. Foram avaliadas amostras de leite com isolamento de *Streptococcus agalactiae* (47), *Streptococcus dysgalactiae* (24), *Streptococcus uberis* (30), *Enterococcus faecalis* (20) e de 83 amostras microbiologicamente negativas. Para a análise estatística, com a utilização do software GraphPad InStat versão 3.05, os parâmetros bioquímicos foram comparados entre as amostras microbiologicamente negativas e positivas

pele teste não-paramétrico de Mann-Whitney, à exceção dos resultados da crioscopia, analisados pelo teste t de Student. A comparação dos parâmetros da CCS de acordo com as espécies de *Streptococcus* spp envolvidas em cada caso de mastite subclínica foi realizada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (TRIOLA, 1999).

A correlação entre os valores de CCS para amostras microbiologicamente positivas e negativas e os valores físico-químicos avaliados foi verificada, utilizando o teste de correlação linear de Spearman (r) (TRIOLA, 1999).

## Resultados e Discussão

Após a classificação taxonômica dos agentes isolados, foram obtidas 604 amostras microbiologicamente positivas e 83 negativas, com isolamento de *Streptococcus* spp em 121 amostras. Foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre as amostras positivas para *Streptococcus* spp e negativas para esse agente no que se refere à densidade, gordura, teor de cloretos e CCS. Quanto à proteína, EST,

**TABELA 1** - Estatística descritiva entre as amostras positivas para *Streptococcus* spp e microbiologicamente negativas, para as variáveis densidade, proteína, gordura, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), acidez, teor de cloretos e contagem de células somáticas (CCS). Botucatu, 2005

Variáveis	Positivos				Negativos				Estatística	
	N	Mediana	Mínimo	Máximo	N	Mediana	Mínimo	Máximo	U	P
Densidade	121	1,034	1,024	1,036	83	1,033	1,015	1,038	4040,0	<b>0,0151</b>
Proteína	121	3,13	0,70	5,60	83	3,05	1,10	5,31	4966,0	0,8944
Gordura	121	2,50	0,65	5,29	83	2,70	0,80	8,00	4280,5	<b>0,0369</b>
EST	121	12,05	9,09	14,06	83	11,87	9,07	18,64	4687,0	0,4201
ESD	121	9,82	6,24	10,87	83	9,21	6,54	17,48	4661,0	0,3848
Acidez	121	16	7	22	83	16	9	20	4405,5	0,1367
Teor cloretos	107	0,15	0,06	0,29	51	0,06	0,04	0,20	1378	<b>&lt;0,0001</b>
CCS	121	1798	5	9999	56	163	0	2330	503,0	<b>&lt;0,0001</b>

Estatística: teste não paramétrico de Mann-Whitney (U); valores de  $p < 0,05$  indicam diferença estatisticamente significativo.

ESD e acidez, não foram observadas diferenças estatísticas significativas (Tabela 1).

Quanto à densidade, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0151$ ) entre as amostras positivas e negativas (Tabela 1). Embora os valores de densidade obtidos nos dois grupos se encontrem dentro dos padrões de normalidade, observa-se que a mediana dos valores do grupo positivo é de 1,034 g/mL, superior a do grupo negativo, de 1,033 g/mL (Tabela 1). Esses dados estão de acordo com NICOLAU *et al.* (1998), que estudaram as alterações físico-químicas do leite nas mastites subclínicas, e também com ZAFALON *et al.* (2000), que estudaram as influências do tratamento da mastite subclínica sobre as características físico-químicas do leite.

Para a porcentagem de gordura, o valor para o grupo de amostras positivas foi de 2,5%, contrastando com 2,7% do grupo negativo, com valor de  $P=0,0369$  (Tabela 1). A redução do teor de gordura no leite de glândulas mamárias infectadas decorre de lesões no parênquima, que levam à redução da secreção dela. Tanto a mediana dos valores correspondentes ao teor de gordura no leite do grupo microbiologicamente

negativo quanto a do positivo para *Streptococcus* spp, estão abaixo do exigido pelas normas vigentes. Outros fatores, além da mastite, como o manejo alimentar e até mesmo a produção afetam esse parâmetro, como demonstrado por AKERLIND *et al.* (1999), que ressaltam que quanto maior a produção do animal, menor é a porcentagem de gordura das amostras de leite. FERREIRO *et al.* (1980), PONCHIEDA (1989) obtiveram uma redução no teor de gordura em amostras de leite provenientes de animais com mastite, o que está de acordo com o presente estudo.

Ao avaliar o teor de cloretos do leite, é importante ressaltar que vários fatores podem acarretar alterações, tais como período de lactação, sazonalidade e turno de ordenha (VASCONCELOS *et al.*, 1997; AMARAL *et al.* 1998). O valor da mediana para o grupo positivo para o *Streptococcus* spp foi de 0,15%, contrastando significativamente ( $P < 0,001$ ) com o grupo negativo, de 0,06% (Tabela 1) e estão de acordo com VIANNI & NADER FILHO (1990), AFONSO & VIANNI (1995) e AMARAL *et al.* (1998), que também relataram diferenças significativas nos teores de cloretos no leite de vacas com mastite subclínica, com aumentos de até

70% em algumas situações.

Quanto à proteína, MUNRO *et al.* (1984) reportaram que são conflitantes e de grande variabilidade os relatos sobre os efeitos da mastite na concentração total de proteínas do leite. Sabe-se que no leite de animais com mastite há um aumento das proteínas oriundas do sangue, possivelmente devido a alterações da integridade do epitélio mamário, pela ação de toxinas bacterianas e da permeabilidade vascular (PAAPE *et al.*, 1995). São exemplos dessas proteínas a caseína não nitrogenada, a albumina sérica (POUTREL *et al.*, 1983) e a imunoglobulina G (CAFFIN *et al.*, 1983). LACY-HULBERT *et al.* (1996) estudaram glândulas mamárias experimentalmente infectadas por *Streptococcus uberis* e observaram um aumento nas concentrações das proteínas séricas em relação aos animais não infectados. A redução da porcentagem total de proteínas, como encontrado neste estudo, pode ser justificada pela redução na concentração de caseína durante o processo inflamatório (KITCHEN, 1991; MUNRO *et al.* 1984), fenômeno que pode ser explicado pela degradação da caseína após a sua secreção, por proteinases de origem bacteriana, leucocitária ou sanguínea (GRIEVE & KITCHEN, 1985).

O valor da mediana para a CCS das amostras positivas para *Streptococcus* spp foi de  $1,8 \times 10^5$  céls/mL

( $P < 0,001$ ). Tal elevação vem sendo relacionada com perdas na produção de leite em animais com mastite subclínica e os dados obtidos estão de acordo com EBERHART *et al.*, (1982); KEHRLI & SHUSTER (1994), HARMON (1998), e PEREIRA *et al.* (1999). A identificação do agente é de extrema relevância, pois se sabe que o *Streptococcus agalactiae*, ocasiona altas contagens de células somáticas. Como se pode verificar na Tabela 2 e Figura 1, os valores da CCS para o *Streptococcus agalactiae* foi superior às outras espécies de *Streptococcus* spp estudadas, o que está de acordo com VIANNI & NADER FILHO (1990), que obtiveram medianas de  $1,9 \times 10^5$  cls/ml em amostras de leite procedentes de casos de mastite subclínica, cujo agente era o *S. agalactiae*. A IDF-INTERNACIONAL DAIRY FEDERATION (1981), cita valores de  $2,7 \times 10^2$  a  $7,8 \times 10^5$  céls/mL de leite para o *S. agalactiae*.

Quando se observa o aumento da CCS nas amostras de leite positivas comparadas às negativas, com as amostras compostas do leite das glândulas mamárias de cada animal, obtém-se o coeficiente de correlação de Spearman  $r = 0,3892$ ;  $p < 0,001$  (Tabela 3). O grupo das amostras positivas para o *Streptococcus* spp contribui para a elevação celular da amostra de leite composta, levando a alterações significativas no que concerne à CCS, o que concorda com WARD &

**TABELA 2** - Valores de estatística descritiva entre as amostras do grupo negativo e aquelas com isolamento de *Streptococcus* spp, para a variável contagem de células somáticas, x1000 células por mL. Botucatu, 2005

Amostras	N	Mediana	Mínimo	Máximo
Negativos	56	163 <sup>a</sup>	0	2330
<i>Streptococcus agalactiae</i>	47	2288 <sup>b</sup>	69	9999
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	24	1842 <sup>b</sup>	126	9999
<i>Streptococcus uberis</i>	30	1825 <sup>b</sup>	5	9999
<i>Enterococcus faecalis</i>	18	707 <sup>b</sup>	160	9999

Estatística: teste de Kruskal-Wallis -  $KW=89,447$ ;  $p < 0,0001$ .

**TABELA 3** - Distribuição dos valores medianos, máximos e mínimos e o valor da correlação entre a contagem de células somáticas, em x1000 células/mL, de glândulas mamárias microbiologicamente negativas, positivas para *Streptococcus* spp e das amostras compostas. Botucatu, 2005

Grupo	CCS		
	Mediana	Mínimos	Máximos
Glândulas negativas	232 <sup>a</sup>	1	3309
Glândulas positivas	1515 <sup>c</sup>	23	999
Compostas	634 <sup>b</sup>	46	5891

Estatística: coeficiente de correlação de Spearman  $r=0,3892$  ( $0,2191 - 0,5394$ );  $p < 0,0001$ ; teste não-paramétrico de Friedman para amostras dependentes  $F=120,60$ ,  $p < 0,001$ , valores medianos seguidos de letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.

SCHULTZ (1972), WANASINGHE & FROST (1979), HARMON (1998), e PEREIRA *et al.*, (1999).

Quanto à correlação entre a CCS e os aspectos físico-químicos estudados, houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras microbiologicamente positivas e negativas somente para o teor de cloretos ( $r = 0,4453$ ;  $p < 0,0001$ ), evidenciando que, à medida que se eleva a CCS na mastite subclínica, há aumento do teor de cloretos, concordando com AFONSO & VIANNI (1995); SCHULTZ

(1997) e AULDIST *et al.* (1995).

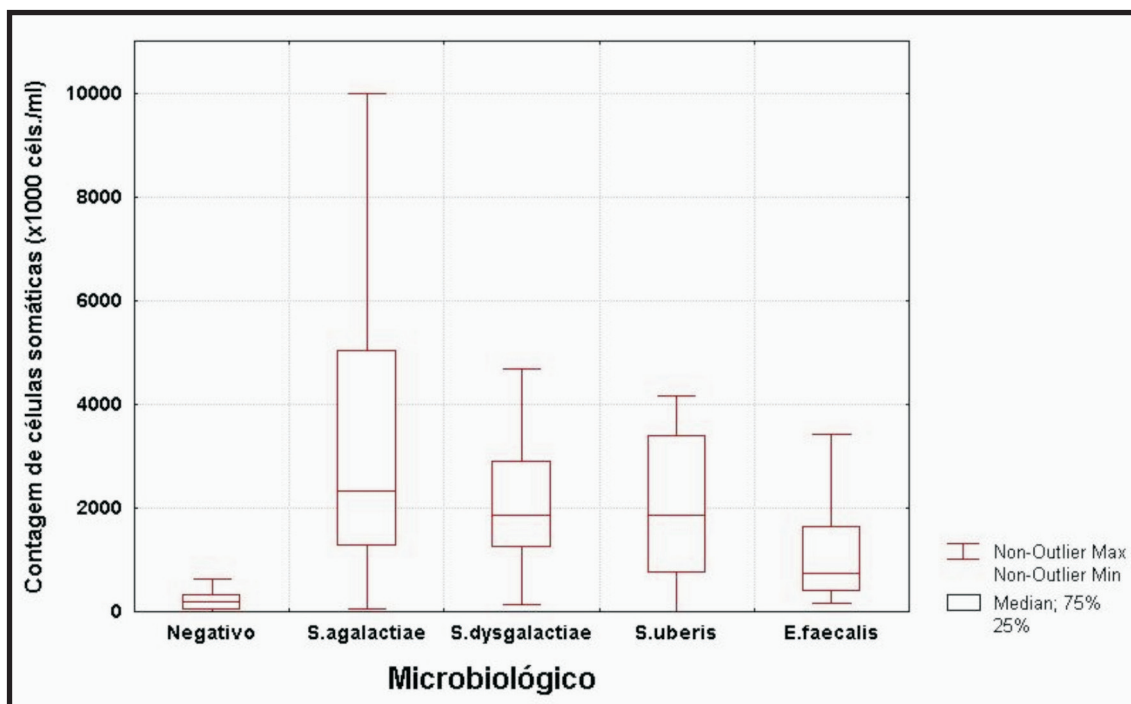


FIGURA 1 - Distribuição dos valores da mediana, máximos e mínimos, para contagem de células somáticas em células por ml de leite, entre as amostras microbiologicamente negativas e aquelas com isolamento de *Streptococcus* spp. Botucatu, 2005

### Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que espécies de *Streptococcus* spp são responsáveis por alterações estatisticamente significativas na densidade, gordura, teor de cloretos e contagem de células somáticas do leite. A CCS revela que entre as várias espécies estudadas, *Streptococcus agalactiae* propiciou a maior elevação, mas o *Streptococcus dysgalactiae*, o *Streptococcus uberis* e o *Enterococcus faecalis* contribuem também de forma significativa para o seu aumento. Para todas as espécies do agente estudadas, há também uma correlação positiva entre a CCS e o teor de cloretos.

### Referências

- AFONSO, J. A. B.; VIANNI, M. C. E. Variação no teor de cloretos e acidez Dornic no leite de vacas com mastites induzida experimentalmente. *Rev. Univ. Rural*, v. 16, n.1-2, p. 2-6, 1995.
- AKERLIND, M. *et al.* Glucose challenge in early lactating dairy cows selected for high or low milk-fat concentration, *J. An. Sci.* v. 68, p. 717, 1999.
- AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; LEW, B. J. Estudo da variação do teor de cloretos no colostro e no leite de vacas sadias. *Ars Vet.* v. 4, p. 105-112, 1998.
- AULDIST, M. J. *et al.* Changes in the Composition of Milk From Normal and Mastitic Dairy Cows During the Lactation Cycle. *Australian J. Exp. Agric.*, v. 35, p. 427-436, 1995.
- BLOOD, D. C.; RADOSTITIS, O. M. *Clínica veterinária*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 424-63.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes*. II Métodos Físico-Químicos. Brasília,

1981.

CAFFIN, J. P.; POUTREL, B.; RAINARD, P. Physiological and pathological factors influencing bovine  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin concentrations in milk. *J. Dairy Sci.* v. 68, p. 1087-1094, 1985.

COSTA, E. O. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *J. Vet. Med. B.* v. 45, p. 65-71, 1998.

CHRISTIE, R.; ATKINS N. E.; MUNCH-PETERSON, E. A note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* v. 22, p. 197-200, 1944.

EBERHART, R. J.; HUTCHINSON, L. J.; SPENCER, S. B. Relationships of bulk tank somatic cell counts to prevalence of intramammary infection and to indices of herd production. *J. Food. Protect.* v. 45, p. 1125, 1982.

FARNSWORTH, R. J. Indications of contagious and environmental mastitis pathogens in a dairy herd. In: *ANNUAL MEETING NACIONAL. MASTITIS COUNCIL*, 1987, EUA, Proceedings... EUA, 1987. p. 151-155.

FERREIRO, L.; SOUZA, H. M.; HEINECK, L. A. Influência da mastite bovina subclínica na composição físico-química do leite do gado mestiço *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes*, p. 19-24, 1980.

GONZALEZ, R. N. *et al.* Relationship between mastitis pathogen numbers in bulk tank milk and bovine udder infections in California dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 189, p. 442-445, 1986.

GRIEVE, P.A.; KITCHEN, B. J. Proteolysis in milk; the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of l.

HARMON, R. J. Fatores que afetam as contagens de células somáticas. In: *Simpósio Internacional sobre qualidade do leite*, 1, 1998. Anais ... Curitiba, 1998. p. 36-39.

IDF-INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. The IDF group of experts on mastitis. Laboratory methods for use in mastitis work.