

ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL EM AMOSTRAS DE LEITE

MICROBIOLOGICAL ISOLATION, SOMATIC CELL COUNT AND TOTAL BACTERIAL COUNT IN SAMPLES MILK

U. V. C. ANDRADE^{1*}, W. HARTMANN¹, M. L. MASSON²

RESUMO

Foram coletadas amostras de leite não pasteurizado de três rebanhos da raça Jersey na região de Curitiba, Estado do Paraná, no período de janeiro a dezembro de 2009. As amostras foram subdivididas em três alíquotas para a realização das seguintes análises: isolamento bacteriano, determinação da CBT (contagem bacteriana total), da CCS (contagem de células somáticas) e dos principais constituintes do leite (gordura e proteína). Foram realizadas duas coletas mensais de todas as vacas do rebanho, totalizando 1132 amostras. Nos 966 isolamentos realizados, os microrganismos isolados foram *Staphylococcus spp* (32,7%), *Staphylococcus aureus* (19,5%), *Streptococcus agalactiae* (14%), *Escherichia coli* (13,6%) e *Bacillus spp* (4,55%) principalmente. As médias de CBT, CCS, da concentração de gordura, proteína e produção mensal de leite foram respectivamente: 4,21 log₁₀UFC x mL⁻¹; 5,84 log₁₀UFC x mL⁻¹; 3,96 g/100g; 3,45 g/100g e 11,61 kg.

PALAVRAS-CHAVE: CCS. Gordura. Leite. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Samples were collected of raw milk from three herds of Jersey cows, in different stages of lactation in the region of Curitiba, Paraná State, from January to December 2009. The milk samples were subdivided into three parcels, to perform the following tests: bacterial isolation, determination of CBT (total bacterial count), SCC (somatic cell count) and the main milk components (fat and protein). There were two monthly sampling of all cows of the herd, totaling 1132 samples. In the 966 isolates, the isolated microorganisms were *Staphylococcus spp* (32.7%), *Staphylococcus aureus* (19.5%) and *Streptococcus agalactiae* (14%), *Escherichia coli* (13.6%) e *Bacillus spp* (4.55%) mainly. The mean CBT, SCC, the concentration of fat, protein and milk production were respectively 4.21 log₁₀UFC x mL⁻¹; 5.84 log₁₀UFC x mL⁻¹; 3.96 g/100g, 3.45 g / 100g and 11.61 kg.

KEY WORDS: SCC. Fat. Milk. *Staphylococcus aureus*.

¹ Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Paraná (UFPR) Centro Politécnico - Setor de Tecnologia - Jardim das Américas. Cx. Postal 19011 - 81531-990, Curitiba-PR - Fone (41) 3361-3232 E-MAIL: u.cotarelli@bol.com.br

* Autor para correspondência. Fone: +5514419644-0005 E-mail: uriel.andrade@utp.br

² Docente Permanente/Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UFPR.

INTRODUÇÃO

O Brasil tem apresentado grandes avanços nos últimos cinco anos em relação à qualidade microbiológica do leite produzido, principalmente após a implementação da nova legislação para o setor de lácteos. No entanto, problemas relacionados às infecções nas glândulas mamárias das vacas em produção resultam em leite não pasteurizado refrigerado com altas contagens bacterianas totais e altas contagens de células somáticas. Estas estão relacionadas com perdas de produção, qualidade e modificações na composição físico-química do produto, conseqüentemente, diminuição do tempo de prateleira.

A qualidade do leite *in natura* pode ser influenciada por muitos fatores, destacando-se os fatores produtivos como sanidade, manejo, alimentação, genética dos rebanhos e os relacionados à obtenção, resfriamento e armazenagem do leite. Dentre estes, a infecção da glândula mamária constitui uma das causas que desempenham maior influência negativa sobre a qualidade e quantidade do leite, resultando no aumento na contagem de células somáticas (CCS), constituídas principalmente por células de defesa, bacterianas e descamação do epitélio glandular (MULLER, 2002, HARTMANN et al., 2009).

A mastite em sua maioria é subclínica, mas pode manifestar sinais clínicos avançados e evoluir para um quadro peragudo. Os patógenos maiores incluem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, coliformes e todos os *Streptococcus spp*, que não o *Streptococcus agalactiae*. Os principais patógenos menores são *Corynebacterium bovis* e estafilococos coagulase-negativos (HARMON, 1998).

O presente trabalho de pesquisa teve o objetivo de demonstrar o perfil da flora bacteriana presente, bem como isolar e identificar os principais agentes microbianos potencialmente causadores de mastite bovina. Também, determinar as respectivas contagens bacterianas, contagem de células somáticas presentes e suas possíveis influências nas concentrações de gordura e de proteína em amostras de leite, de rebanhos leiteiros localizados na região metropolitana de Curitiba.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de leite *in natura*

Foram coletadas amostras contendo 210 mL de leite, divididas em três alíquotas de 70 mL cada, oriundas de 48 vacas em lactação da raça Jersey, escolhidas aleatoriamente, em diferentes estágios de lactação, de três rebanhos leiteiros com respectivamente 28, 16 e 31 animais e com média de produção de 13 litros/vaca/dia, localizados na região metropolitana de Curitiba, Estado do Paraná, no período de janeiro a dezembro de 2009.

Estes rebanhos apresentavam sala de ordenha com sistema de coleta de leite canalizado, manejo de ordenha constituído de duas ordenhas, uma no período matutino e outra no período vespertino com intervalo de 12 horas, com tanque refrigerador e manejo nutricional constituído de regime extensivo com suplementação de concentrado. A coletada de amostras foi cumulativa ao final das 2 ordenhas completas e foram subdivididas em três alíquotas, para a realização das seguintes análises: isolamento bacteriano, determinação da CBT (contagem bacteriana total), da CCS (contagem de células somáticas) e a determinação dos principais constituintes do leite (concentração de gordura e proteína) e produção mensal de leite. Foram realizadas duas coletas mensais por vaca, totalizando 1132 amostras.

Isolamento bacteriano

De cada amostra coletada, a alíquota 1 foi destinada à realização de isolamento e tipificação bacteriana. Estas foram colhidas de todos os quartos mamários sob condições assépticas com prévia limpeza externa dos tetos com solução álcool iodada, totalizando 1132 amostras. As amostras foram colocadas em tubos de *Vacuntainer* estéreis e mantidas sob refrigeração para o cultivo microbiológico. Foram então submetidas a exames microbiológicos, sendo plaqueadas em ágar MacConkey e ágar Sangue (sangue de carneiro 5%) e incubadas a 37°C por 24-48 horas. As colônias foram submetidas a provas bioquímicas e de diferenciação bacteriana quando em crescimento no ágar MacConkey (CHI et al, 2001). As leituras das placas foram procedidas às 24 e 48 horas com a descrição da macromorfologia. A micromorfologia foi executada através de esfregaço em lâmina e corada pela Técnica de Gram. A identificação microbiológica foi realizada com base nas características morfológicas, bioquímicas e tintoriais de acordo com QUINN et al (2005).

Contagem bacteriana total (CBT)

A alíquota 2 contendo o conservante Azidol® (BS Pharma, Belo Horizonte) composto por 0,11975 mg de azida de sódio e 0,005 mg de cloranfenicol por mL, foi destinada à contagem bacteriana total. As análises foram realizadas em um prazo não superior a 24 horas após a coleta, no equipamento IBC (BENTLEY INSTRUMENTS INC.) (BENTLEY INSTRUMENTS, 1997). De acordo com as normas FIL 100B: 1991 (BRASIL, 2001). Os resultados foram transformados em logaritmo na base 10 (SANTANA et al., 2001, COELHO et al., 2001, SANTOS, 2002).

Determinação dos constituintes do leite e CCS

A alíquota 3 foi mantida sob refrigeração e adicionada do conservante Bronopol® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), para contagem de células somáticas no equipamento modelo Somacount 500 (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, MN), por citometria de fluxo (IDF/FIL 148A), e para determinação da concentração de matéria gorda e proteína, no equipamento automatizado Bentley 2000 (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, MN) (BENTLEY INSTRUMENTS, 1997). As análises

foram realizadas em um prazo não superior a 24 horas após a coleta, segundo as normas FIL 148 A: 1995 (BRASIL, 2001). Os resultados foram transformados em logaritmo na base 10 (SANTANA et al., 2001, COELHO et al., 2001, SANTOS, 2002).

Análises Estatísticas

O delineamento experimental adotado baseou-se em arranjo fatorial completamente casualizado. Para o conjunto das análises estatísticas, foi utilizado o programa computadorizado STATISTICA® (6.0). A análise de variância foi realizada, considerando os seguintes efeitos: Meses = 12 (de janeiro a dezembro); CCS (n=7: 0 a 50.000 cel/mL; de 50.001 a 100.000 cel/mL; de 100.001 a 200.000 cel/mL; de 200.001 a 400.000 cel/mL; de 400.001 a 750.000 cel/mL; de 750.001 a 1.000.000 cel/mL e acima de 1.000.000 cel/mL); CBT (n= 4: 0 a 10.000 UFC/mL; de 10.001 a 50.000 UFC/mL; de 50.001 a 100.000 UFC/mL e acima de 100.000 UFC/mL) e interação entre CCS e CBT.

Para o estudo das concentrações de gordura, proteína e da produção de leite adotou-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + M_i + S_j + CB_k + S*CB_l + e_{ijkl}.$$

Onde:

Y_{ijkl} = produção de leite, concentração de gordura e proteína em função de diferentes efeitos;

μ = média geral do experimento;

M_i = efeito fixo de meses i , sendo $i = 1 =$ (Janeiro), $2 =$ (Fevereiro)...e $12 =$ (Dezembro);

S_j = efeito fixo de CCS j , sendo $j = 1 =$ (0 a 50.000 cel/mL), $2 =$ (de 50.001 a 100.000 cel/mL), $3 =$ (de 100.001 a 200.000 cel/mL), $4 =$ (de 200.001 a 400.000 cel/mL), $5 =$ (de 400.001 a 750.000 cel/mL), $6 =$ (de 750.001 a 1.000.000 cel/mL) e $7 =$ (acima de 1.000.000 cel/mL);

CB_k = efeito fixo de CBT k , sendo $k = 1 =$ (0 a 10.000 UFC/mL), $2 =$ (10.001 a 50.000 UFC/mL), $3 =$ (50.001 a 100.000 UFC/mL) e $4 =$ (acima de 100.000 UFC/mL);

$S*CB_l$ = efeito da interação entre os efeitos CCS e CBT;

e_{ijkl} = erro experimental

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total das 1132 amostras, 60 (5,3%) estavam coaguladas e foram descartadas, 966 (85,3%) apresentaram crescimento de grupos microbianos e 106 (9,4%) não apresentaram nenhum tipo de crescimento após incubação a 37°C por até 48 horas.

Na Figura 1, está apresentado o perfil microbiano dos 966 isolamentos realizados nos exames microbiológicos.

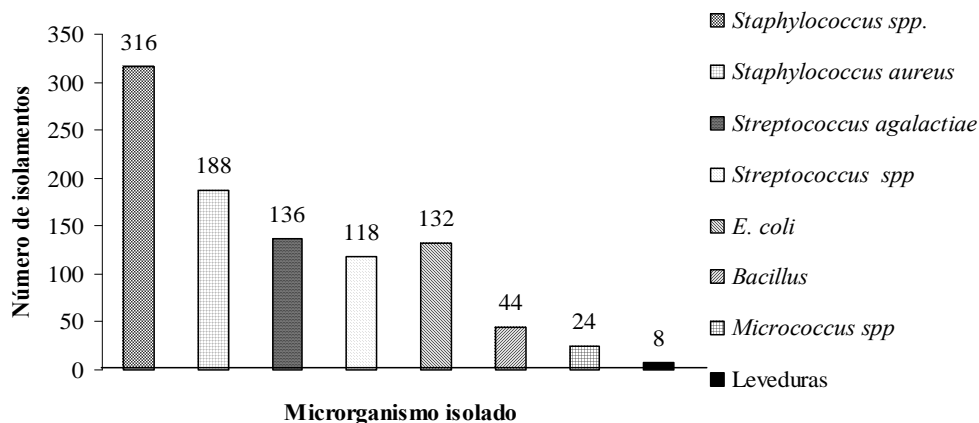


Figura 1 - Perfil dos 966 isolamentos bacterianos em amostras de leite de um rebanho leiteiro da região metropolitana de Curitiba.

Isolamento bacteriano

Nos 966 isolamentos realizados, 85,5% (826 isolamentos) eram bactérias Gram positivas, 13,7% (132 isolamentos) eram bactérias Gram negativas e 0,8% (8 isolamentos) eram leveduras. Os microrganismos isolados com maior frequência foram *Staphylococcus spp* (32,7%), *Staphylococcus aureus* (19,5%) e *Streptococcus agalactiae* (14%). Estes

resultados são semelhantes aos descritos por CHI et al (2001). Os autores estudando um rebanho de São José dos Pinhais, estado do Paraná, obtiveram os seguintes isolamentos: *Staphylococcus spp* (29,5%), *Staphylococcus aureus* (16%). As bactérias do gênero *Staphylococcus spp*, continuam sendo os agentes mais frequentemente isolados em rebanhos leiteiros, representando grande importância epidemiológica e

clínica nas mastites bovinas associadas a falhas no manejo de ordenha, na prevenção e diagnóstico da mastite contagiosa dos rebanhos, em que a transmissão dos agentes causadores é predominantemente causada durante a ordenha, uma vez que o reservatório do gênero *Staphylococcus* é a glândula mamária (LONGO et al. 1994, COSTA et al. 1995, CHAPAVAL et al. 2000).

E. coli e *Bacillus spp* também tiveram percentuais consideráveis nos isolamentos, com 13,6% e 4,55% respectivamente. As enterobactérias, como *E. coli*, são microrganismos mesófilos que estão presentes devido à falta de higiene. No ambiente, alguns microrganismos estão presentes na água, solo e cama dos animais, sendo que, dentre estes destaca-se o *Bacillus spp*, que é capaz de provocar doenças em seres humanos pela ingestão do leite não pasteurizado, em condições especiais (FONSECA, et al. 2000).

Estes resultados são condizentes com as condições observadas nas propriedades visitadas, uma vez que as mesmas geralmente não adotavam medidas higiênicas corretas no período pré e pós ordenha.

Medidas descritivas

As médias e os respectivos desvios-padrão da CCS, CBT, produção média de leite, concentração de gordura e proteína, juntamente com os valores referentes ao resumo da análise de variância, estão descritos na Tabela 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1 – Número de observações (n), médias estimadas, desvios - padrão (dp) das características produtivas.

	N	Média	DP
CCS (\log_{10} UFC x mL ⁻¹)	1132	5,84	5,43
C.B.T.(\log_{10} UFC x mL ⁻¹)	1132	4,21	4,02
PRODUÇÃO DE LEITE (kg/dia)	48	11,61	3,57
GORDURA (g/100g)	1132	3,96	0,76
PROTEÍNA (g/100g)	1132	3,45	0,38

Tabela 2 – Resumo da análise de variância sobre as características produtivas.

Variáveis	Graus de Liberdade	F Tipo III	Probabilidade
MÊS DE CONTROLE	11	11,68	0,0001
CCS	06	7,81	0,0001
CBT	03	5,01	0,0001

* Os efeitos testados foram altamente significantes ($p < 0,01$)

Na Figura 2 está apresentado o comportamento das produções médias de leite, concentração de gordura e proteína em função do mês de produção dos rebanhos analisados.

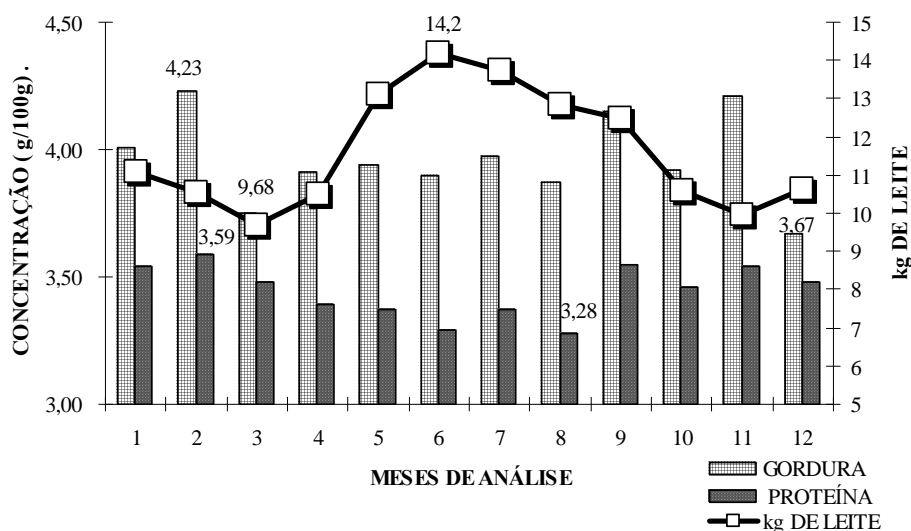


Figura 2 – Desempenho mensal da produção de leite e concentrações de gordura e proteína.

As médias das concentrações de gordura e proteína, foram respectivamente 3,96 g/100g e 3,45 g/100g, com as maiores concentrações de gordura e proteína descritas no mês de fevereiro, sendo 4,23 g/100g e 3,59 g/100g, respectivamente.

Estas médias estão abaixo dos valores encontrados por RIBAS et al (2004), que descreveram valores médios para concentração de gordura de 4,49 g/100g e concentração de proteína igual a 3,68 g/100g, em 2242

vacas Jersey, de rebanhos oficialmente controlados no estado do Paraná.

A produção média de leite foi de 11,61 kg, a maior produção foi verificada no mês de junho (14,2 kg) e a menor foi no mês de março (9,68 kg). A variação da produção em 31,8% se deve principalmente ao fornecimento das pastagens de inverno. Nestes meses observa-se redução na concentração de gordura e de proteína; estas variações são justificadas pelas diferenças na temperatura ambiente entre os meses, que influenciam diretamente o consumo de matéria seca, o metabolismo, bem como a qualidade das forragens disponíveis (STAINES et al., 2000).

O efeito do mês de análise também se mostrou significativo ($P < 0,01$). Este fato está de acordo com os relatos de Ponsano et al. (1999), demonstrando que as concentrações de gordura e proteína sofrem periodicidade anual.

Diante das médias apresentadas, medidas corretivas no manejo nutricional, com fornecimento de volumoso e concentrado de qualidade para as vacas de maior capacidade de produção, seria uma alternativa recomendada para os rebanhos analisados.

Na Figura 3 estão apresentados os comportamentos da produção de leite, concentração de gordura e proteína, em função da influência da CCS sobre os dados analisados.

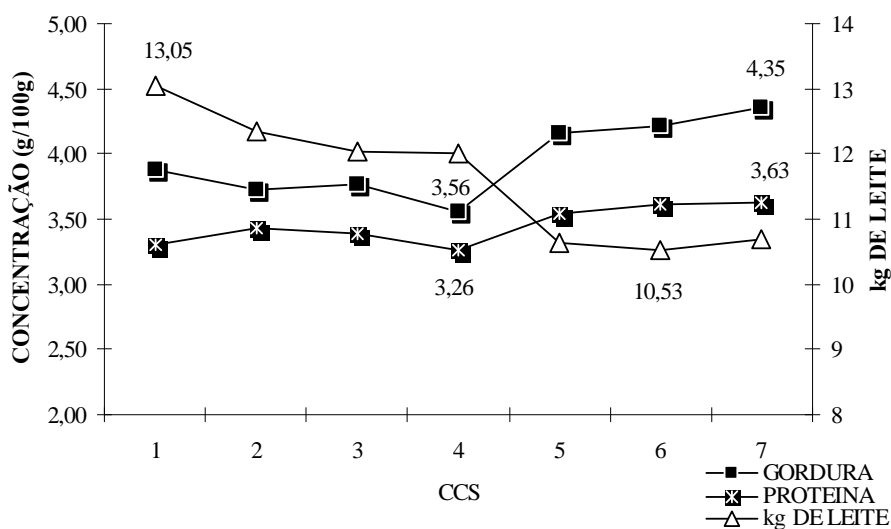


Figura 3 – Influência da CCS sobre a produção de leite, concentração de gordura e de proteína.

A média de CCS foi de $5,84 \log_{10}$ células \times mL^{-1} , que corresponde a 703.069 células/mL. Este valor está acima dos valores descritos por LORENZETTI (2006), que relatou médias de 5,61 e $5,59 \log_{10}$ células \times mL^{-1} para amostras de leite não pasteurizado na região de Curitiba e do Alto Vale (SC), respectivamente e de PAULA et al. (2004), que obtiveram a média de $5,67 \log_{10}$ células \times mL^{-1} em 257.540 amostras de leite de tanques de Santa Catarina, Paraná e São Paulo.

O efeito da CCS também se mostrou significativo ($P < 0,01$). Alguns autores demonstraram em seus estudos que a influência da concentração de células somáticas sobre os constituintes do leite é muito discutida (ROGERS et al, 1989). Estudo realizado por PICININ (2003), em 31 propriedades leiteiras na Região Metropolitana de Belo Horizonte, demonstrou que quanto maior a CCS, menores os teores de gordura

do leite. Entretanto, no presente estudo, verificou-se que houve tendência de aumento no teor de gordura (Figura 3) à medida que a CCS aumentava. Estes resultados foram semelhantes aos descritos por LIMA et al (2006).

Altas CCS representam significativas perdas em produção, devido à formação de tecido cicatricial na região alveolar, em substituição ao epitélio secretor da glândula mamária (BLOWEY e EDMONDSON, 1999). Segundo Cardoso (2005), a mastite subclínica é responsável por perdas de 70 a 80% na produção de leite.

Na Figura 4 estão apresentados os comportamentos da produção de leite, concentração de gordura e proteína, em função da influência da contagem bacteriana total sobre os dados analisados.

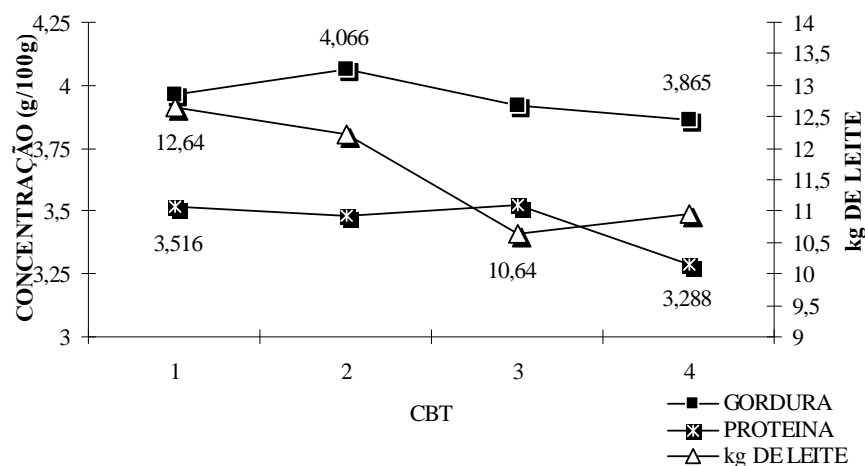


Figura 4 – Influência da cbt sobre a produção de leite, concentração de gordura e de proteína.

A contagem bacteriana total (CBT) apresentou média de $4,21 \log_{10} \text{ UFC x mL}^{-1}$, que corresponde a 16.355 UFC/mL. Este resultado é considerado apropriado pelos critérios da I.N. 51/2002, que estabelece $5,87 \log_{10} \text{ UFC x mL}^{-1}$ como limite máximo de CBT (BRASIL, 2002). Porém, 28% das amostras estudadas apresentaram índices de CBT acima do limite estabelecido.

O efeito da CBT também se mostrou significativo ($P < 0,01$), com tendência de diminuição nas médias de concentrações de gordura e proteína e no volume de leite produzido. Alguns autores demonstraram que existe a influência da CBT sobre os constituintes do leite. De acordo com Bueno et al (2008), que estudaram a influencia da CBT e a relação com a composição centesimal e período do ano no estado de Goiás, conforme ocorre a elevação da contaminação bacteriana, ocorre pequeno aumento da concentração de proteína. Porém, os autores destacam que o aumento das concentrações de gordura não apresentaram alterações significativas.

CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que os *Staphylococcus spp* foram os microrganismos mais frequentemente isolados nos rebanhos estudados. Dessa forma, medidas de higiene e prevenção, com manejo correto de pré e pós ordenha tornam-se necessárias, uma vez que, estes microrganismos são os maiores causadores de mastite em diversos rebanhos leiteiros. A concentração de gordura e proteína, bem como o volume de leite produzido, foram influenciados pela contagem bacteriana total, pela contagem de células somáticas e pelos meses do ano.

AGRADECIMENTOS

Laboratório Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa

(APCBRH) em convênio técnico com a Universidade Federal do Paraná.

REFERÊNCIAS

- BENTLEY INSTRUMENTS INC. **Somacount 300 Operator's Manual**. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1997. 116 p.
- BLOWEY, R., EDMONDSON, P. **Control de la mastitis**. Zaragoza: Acribia, 1999.
- BRASIL. **Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002**. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade, coleta e transporte de leite. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Secretaria de Inspeção de Produto Animal, 2002, 39 p.
- BUENO, V. F. F., MESQUITA, A. J., OLIVEIRA, A. N., NICOLAU, E. S., NEVES, R. B.S. Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e período do ano no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 15, n. 1, p. 40-44, jan./abr. 2008.
- CARDOSO, V. L., MONSALVES, F. M., EL FARO, L. Valores econômicos para ocorrência de mastite clínica e contagem de células somáticas em um sistema intensivo de Produção de Leite. **42º Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Goiânia, Goiás. cd-rom. 2005.
- CHAPAVAL, L., PIEKARSKI, P. R. B. **Leite de Qualidade**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2000. 195p.
- CHI, K., ANDRADE, U., FERREIRA, A. Sanitary program in dairy cattle. **Archives of Veterinary Science [Online]** 2004.

- COELHO, P. S., SILVA, N., BRESCIA, M. V. Avaliação da qualidade microbiológica do leite UAT integral comercializado em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.53, no.2, p.1-7. Belo Horizonte, 2001.
- COSTA, E. O. Estudo epidemiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 17, n. 4, p.21-26, 1995.
- FONSECA, L. F. L., SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
- HARMON, R. J. Fatores que afetam a contagem de células somáticas. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1998, Curitiba. **Anais**. Curitiba, 1998. p.08.
- HARTMANN, W. **Características físico-químicas, microbiológicas, de manejo e higiene na produção de leite bovino na região oeste do Paraná: ocorrência de listeria monocytogenes**, Curitiba, PR, 2009. Tese de Doutorado – Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2009.
- LIMA, M. C. G., SENA, M. J., MOTA, R. A., MENDES, E. S., ALMEIDA, C. C., SILVA, R. P. P. E. Contagem de células somáticas e análises físico-químicas e microbiológicas do leite não pasteurizado tipo C produzido na região agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto Biológico São Paulo**, v.73, n.1, p.89-95, jan./mar., 2006
- LONGO, F., BEGUIN, J. C., CONSALVI, P. J., DELTOR, J. C. Quelques données épidémiologiques sur les mammites subcliniques de la vache laitière. **Revue Médecine. Veterinaire**. v.145, n.1, p.43-47, 1994.
- LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite não pasteurizado de dois estados da região sul**. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Paraná. 2006.
- NEIVA, A. C. G. R., NEIVA, J. N. M. **Do campus para o campo**. Tecnologias para a produção de leite. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora Ltda., 2006. 320 p.
- MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2. **Anais...**, p.206-217. Maringá, 2002.
- PAULA, M. C., RIBAS, N. P., MONARDES, H. G., ARCE, J. E., ANDRADE, U. V. C. Contagem de células somáticas em amostras de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n.5, 2004.
- PICININ, L. C. **A Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais**: 2003. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.
- PONSANO, E. H. G., PINTO, M. F., LARA, J. A. F. Variação sazonal e correlação entre propriedades do leite utilizadas na avaliação de qualidade. **Revista Higiene Alimentar**, n.64. p.4, 1999.
- QUINN, P. J., MARKEY, B. K., CARTER, M. E., DONNELLY, W. J., LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- RIBAS, N., ALMEIDA, R. 2004. Estudo de alguns fatores de meio ambiente sobre as produções de leite, gordura e proteína em vacas da raça Jersey no estado do Paraná. **Archives of Veterinary Science** [Online] 4:1. Disponível: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/veterinary/article/view/3841>. Acesso: 05/01/2010.
- ROGERS, S. A., MITCHELL, G. E., BARTLEY, J. P. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. 4. Non-protein constituents. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.44, n.2 p.53-56, 1989.
- SANTANA, E. H. W., BELOTI, V., BARROS, M. A. F., MORAES, L. B., GUSMÃO, V. V., PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semana: Ciências Agrárias, Londrina**, v.22, n.2, p.145-154, 2001.
- SANTOS, D. **Influência da temperatura durante o transporte, na qualidade microbiológica do leite recebido por uma indústria de laticínios no planalto catarinense**. Dissertação de Mestrado n.º308 (Inspeção de Produtos de Origem Animal). Programa Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária, Porto Alegre – UFRGS. 30(1): 67-68, 2002.
- STAINES, V., RUSSEL, B., GALLAGHER, S. **Factors affecting milk composition**. Agriculture Western Australia, Farmnote 5/92. Revisão setembro 2000.