RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 17/02/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, PERFIL DE SENSIBILIDADE E PRODUÇÃO DE BIOFILME DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE TANQUES DE EXPANSÃO DE LEITE BOVINO

Samea Fernandes Joaquim

Botucatu - SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, PERFIL DE SENSIBILIDADE E PRODUÇÃO DE BIOFILME DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE TANQUES DE EXPANSÃO DE LEITE BOVINO

Samea Fernandes Joaquim

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de doutora.

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni
Co-orientador: Dr. Felipe de Freitas Guimarães

Botucatu - SP
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Joaquim, Samea Fernandes.
Caracterização molecular, perfil de sensibilidade e produção de biofilme de Escherichia Coli isoladas de tanques de expansão de leite bovino / Samea Fernandes Joaquim. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Helio Langoni
Coorientador: Felipe de Freitas Guimarães
Capes: 50502000

1. Escherichia coli. 2. Saúde pública. 3. Segurança alimentar. 4. Biofilmes. 5. Leite - Qualidade. 6. Resistência microbiana a medicamentos.

Palavras-chave: Bactérias; Multirresistência a antimicrobianos; Saúde pública; Segurança dos alimentos.

Nome do autor: Samea Fernandes Joaquim

Título: Caracterização molecular, perfil de sensibilidade e produção de biofilme de *Escherichia coli* isoladas de tanques de expansão de leite bovino

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélio Langoni
Presidente e orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Membro Titular
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira
Membro Titular
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Ricardo Seiti Yamatogi
Membro Titular
Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite
Membro Titular
Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia – Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dra. Simone Baldini Lucheis
Membro Suplente
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dra. Elizabeth Oliveira Costa
Membro Suplente
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – FMVZ USP

Prof. Dra. Amanda Keller Siqueira
Membro Suplente
Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO

Data da Defesa: 17 de fevereiro de 2020.

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu avô Nelson Joaquim (in memorian), grande incentivador dos estudos de toda a família.

“A modificação, para a melhora da sociedade humana como um todo, terá de provir das ideias emanadas dos grandes homens, impressas na luz astral, que promoverão a modificação dos homens e, por seus atos, a sociedade. Tudo o que existe está escalonado numa sequência de vibrações harmônicas, da energia princípio para a causa final”.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de Doutorado Direto concedida (Processo 2017/07246-6) e Auxílio à Pesquisa – Projeto Temático (Processo 2015/19688-8).

Agradeço à Faculdade de Medicina de Veterinária e Zootecnia FVMZ UNESP pelas condições e infra-estrutura para viabilizar a execução deste projeto, além de ser minha segunda casa desde 2009 e tornar tantos sonhos ora imaginados, hoje possíveis.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço a Deus, por garantir todo o discernimento e bençãos recebidos durante minha vida.

Agradeço aos meus Pais, Sérgio Fernandes Joaquim e Ana Maria Gomes Joaquim, e minha irmã, Bianca Fernandes Joaquim por serem meus alicerces inabaláveis em todo o meu caminho, meus maiores incentivadores e que não mediram esforços para que cada passo realizado fosse possível. Amo vocês.

Agradeço aos meus três grandes exemplos de veterinários de minha família, Celso Fernandes Joaquim, Jean Guilherme Fernandes Joaquim e Reinaldo José Rodrigues, vocês são minhas inspirações profissionais.

Agradeço toda a minha família em especial meus avós Nelson Joaquim (in memorian), Elisa de Lourdes Fernandes Joaquim, Sebastião Raimundo Gomes (in memorian) e Aparecida Custódio Gomes, e também meus padrinhos Telma Fernandes Joaquim Rodrigues, Reinaldo José Rodrigues e Karina Rodrigues Nardini Gomes pelo incentivo ao longo de toda minha vida.

Agradeço ao meu Orientador, Professor Helio Langoni, por todo o conhecimento repassado, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa em 2011, ainda como aluna de iniciação científica, por todas orientações sejam essas no âmbito profissional, como também pessoal e por toda a paciência ao longo desses anos.

Agradeço ao meu Co-orientador, Felipe de Freitas Guimarães , por cada ensinamento, por cada força e imprescindível ajuda ao longo da execução deste e de

tantos outros trabalhos e, sobretudo, agradeço a amizade.

Agradeço às minhas amigas e companheiras de casa ao longo desses anos de pós graduação, Natalia Moraes Dias, Mayra de Castro Ferreira Lima, Giulia Soares Latosinski, Tatiana Geraissate Gorenstein e Natalie Neuwirt Oliveira por todo apoio, amizade e momentos compartilhados.

Agradeço aos meus amigos de graduação que independente da distância permanecem sempre comigo, dividindo momento felizes, Natalia Sato Minami, Jhônatas Kuhn, Annalú Pinton Ferreira e Fabiana Pighini Orlando.

Agradeço às duas grandes amigas e parceiras em diferentes momentos da pós graduação, Talita Gomes da Silva Batista e Maysa Pelizzaro, que foram as irmãs que pude escolher ao longo dessa trajetória.

Agradeço aos meus amigos do Núcleo de Pesquisa em Mastites e Núcleo de Pesquisa em Zoonoses por todo apoio, colaboração na execução deste trabalho, e ainda, todos os momentos felizes que passamos juntos, Simony Trevizan Guerra, Felipe Morales Dalanezi, Felipe Fornazari, Karine Bott Mantovan, Ana Carolina Yamakawa Bruna Churocof Lopes, Evelyn Cristine Silva, Amanda Bezerra Bertolini, Nássarah Jabur Lot Rodrigues, Marcela de Pinho Manzi, Benedito Donizete Menozzi e Pâmela Merlo Marson.

Agradeço aos meus amigos e incentivadores diários para realização deste sonho, Paulo Henrique Scalada, Carlos Augusto Pires Arruda, Djandira do Nascimento, Letícia Fernanda de Castro Silva e Rodolfo Guilherme Mendonça.

Agradeço a todos os docentes e colaboradores do projeto temático do qual este trabalho faz parte, por toda ajuda no desenvolvimento desta tese de doutorado, em especial ao Professor Márcio Garcia Ribeiro, por todas as elucidações de dúvidas e ao Professor José Carlos de Figueiredo Pantoja pelo auxílio com as análises estatísticas.

A todos vocês, o meu muito obrigada, pois este trabalho não é somente meu, é de todos nós, o qual tenho a honra de apresentá-lo para obtenção deste título.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Genes de produção de biofilme e sequências dos iniciadores empregados nas reações de PCR..... 23

QUADRO 2. Sequência dos oligonucleotídeos empregados para detecção dos genes de produção de ESBLs..... 23

QUADRO 3. Genes de virulência e sequências dos iniciadores usados na pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* extraintestinal (ExPEC)..... 24

QUADRO 4. Genes de virulência e sequências dos iniciadores empregados nas reações de PCR para a pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* diarreiogênicas..... 25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Principais características de produção, rebanho bovino e instalações das fazendas estudadas. Botucatu, SP, 2020..... 16

TABELA 2. Principais características de manejo de ordenha de vacas nas fazendas estudadas. Botucatu, SP, 2020..... 17

TABELA 3. Perfil de sensibilidade *in vitro* (método de difusão em discos) em *E. coli* isolados de tanques de expansão. 27

TABELA 4. Prevalência da produção de biofilme em poliestireno, inox e silicone a partir de isolados de *E. coli* obtidos de amostras de leite de tanques de expansão. Botucatu, 2020..... 28

TABELA 5. Sensibilidade dos isolados de *E. coli* formadores de biofilme em poliestireno a iodo e digluconato de clorexidina após a indução de formação do biofilme com 72h de incubação. FMVZ UNESP, Botucatu, 2020..... 29

TABELA 6. Reação em cadeia da polimerase de isolados de *E. coli* oriundos de leite bovino de tanque de expansão para detecção de genes relacionados à produção de biofilme e produção de ESBLs. FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020... 30

TABELA 7. Reação em cadeia da polimerase de isolados de *E. coli* oriundos de leite bovino de tanque de expansão para detecção de genes relacionados à pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* extraintestinal (ExPEC). FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020..... 31

TABELA 8. Reação em cadeia da polimerase de isolados de *E. coli* oriundos de leite bovino de tanque de expansão para detecção de genes relacionados à pesquisa de fatores de virulência em *E. coli* diarreiogênicas. FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020..... 32

TABELA 9. Associação dos genes relacionados com a produção de biofilme com a produção *in vitro* de biofilme em poliestireno, inox e silicone de isolados de *E. coli* obtidos de leite de tanques de expansão. FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020..... 32

TABELA 10. Associação dos genes relacionados com a produção de fatores de virulência em *E. coli* extra-intestinais (ExPEC) com a produção *in vitro* de biofilme em poliestireno, inox e silicone de isolados obtidos de leite de tanques de expansão. FMVZ, UNESP, Botucatu, 2020..... 33

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Pesquisa fenotípica de ESBL pelo teste de disco-difusão. NUPEMAS, FMVZ, UNESP, 2020..... 21

FIGURA 2. Ficha de silicone utilizada na verificação da produção de biofilme em inox. NUPEMAS, FMVZ, UNESP, 2020..... 22

FIGURA 3. Pesquisa fenotípica de ESBL pelo teste de disco-difusão. NUPEMAS, FMVZ, UNESP, 2020..... 28

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
E. coli	*Escherichia coli*
EPS	exopolissacarídeos
ESBL	enzima β-lactamase de espectro extendido
IRMA	índice de resistência múltipla aos antimicrobianos
STEC	*Escherichia coli* produtora de shiga-like toxina
UHT	ultra high temperature
VTEC	*Escherichia coli* verotoxigênica
ECP	*E. coli* common pilus
SUH	Síndrome urêmica hemolítica
LPS	lipopolissacarídeos
EPEC	*E. coli* enteropatogênica
ETEC	*E. coli* enterotoxigênica
EIEC	*E. coli* enteroinvasora
EHEC	*E. coli* enterohemorrágica
EAEC	*E. coli* enteroagregativa

Sumário

RESUMO 12
ABSTRACT 13
1. INTRODUÇÃO 2
2. REVISÃO DE LITERATURA 5
2.1. Qualidade do leite 5
2.2. Biofilmes 6
2.3. Resistência bacteriana aos antimicrobianos 8
3. OBJETIVOS 12
3.1. Geral 12
3.2. Específicos 12
4. MATERIAL E MÉTODOS 14
4.1. Cálculo do número de amostras 14
4.2. Amostras 14
4.3. Análise microbiológica 18
4.4. Teste de disco-difusão para avaliação da sensibilidade in vitro aos antimicrobianos e obtenção do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos – IRMA 18
4.5. Teste de disco-difusão para investigação de *E. coli* produtora da enzima β-lactamase de espectro extendido(ESBL) 19
4.6. Verificação e quantificação da produção de biofilme em plástico de poliestireno, inox esilicone 19
4.7. Teste de sensibilidade a desinfetante na presença de biofilme 21
4.8. Realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dosisolados 22
4.9. Análise estatística 25
5. RESULTADOS 27
5.1. Teste de disco-difusão para avaliação da sensibilidade in vitro aos antimicrobianos e obtenção do índice de resistência múltipla aos antimicrobianos – IRMA 27
5.2. Teste de disco-difusão para investigação de *E.coli* produtora da enzima β-lactamase de espectro extendido (ESBL) 28
5.3. Verificação e quantificação da produção de biofilme em plástico de poliestireno,inox e silicone 28
5.4. Teste de sensibilidade a desinfetante na presença de biofilme 29
5.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) dos isolados 30
6. DISCUSSÃO 37
6.4. Fatores de virulência em *E. coli* extraintestinais (ExPEC) 46
6.5. Fatores de virulência em *E. coli* diarreiogênicas 47
7. CONCLUSÕES 50
8. REFERÊNCIAS 52
9. ANEXOS 65
10. Artigo científico 67

RESUMO

JOAQUIM, S.F. Caracterização molecular, perfil de sensibilidade e produção de biofilme de *Escherichia coli* isoladas de tanques de expansão de leite bovino. Botucatu – SP, 2020, p.87. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Os coliformes encontrados no leite podem ser de origem animal em casos de mastites ou provenientes de falhas na obtenção higiênica do leite. Estudos moleculares para identificação de estirpes de *Escherichia coli* em tanques de expansão são incipientes. Dessa maneira, o presente estudo indentificou os isolados de *E. coli* presentes em tanques de expansão de propriedades leiteiras, bem como genes associados a fatores de virulência, genes envolvidos na formação de biofilmes e pesquisa de genes de isolados produtores da enzima β-lactamase de espectro extendido (ESBL), além de estudos fenotípicos de multirresistência a antimicrobianos e formação de biofilmes em diferentes materiais. Foram isoladas 149 amostras de *E.* coli, dentre as quais, 24,2% obtiveram índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) >0,3. Quanto a formação de biofilmes, 42,28% dos isolados produziram em plástico de poliestireno, 21,48% em inox e 56,38% em silicone. Quanto à susceptibilidade dos produtores de biofilme ao iodo e digluconato de clorexidine, esses desinfetantes foram capazes de inibir a formação de biofilme, porém tiveram seu efeito diminuído em 25,40% das amostras após a formação do biofilme maduro. Foram detectados genes relacionados com a produção de biofilme, entretanto os genes de *E. coli* common pilus mostraram associação negativa com a produção fenotípica nos materiais analisados ($p<0,05$). Genes de *E. coli* extra-intestinais foram encontrados para adesinas, toxinas, sideróforos e de resistência ao soro. Não foram encontrados genes correlacionados com fatores de virulência de *E. coli* diarreiogênicas.Diante dos resultados obtidos, anseia-se aprofundar o conhecimento desse patógeno, a fim de possibilitar estratégias de controle para melhoria da qualidade do leite de tanques de expansão, visando à saúde pública.

Palavras-chaves: Bactérias, multirresistência a antimicrobianos, saúde pública, segurança dos alimentos.

ABSTRACT

JOAQUIM, S.F. Molecular characterization, sensitivity profile and biofilm production from bulk tank milk *Escherichia coli*. Botucatu – SP, 2020, p.87. Tese (Doutorado) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, Sao Paulo State University –UNESP.

Coliforms found in milk can be of animal origin in cases of mastitis or from faults in the hygienic production of milk. Molecular studies to identify *Escherichia coli* strains in expansion tanks are incipient. Thus, the aim of this study were identify *E. coli* isolates in dairy expansion tanks, genes associated with virulence factors and involved in biofilms formation and identify genes from isolates producers of extended spectrum β-lactamase (ESBL), as well as phenotypic studies of antimicrobial multiresistance and formation of biofilms in different materials. 149 E. coli samples were isolated, among which, 24.2% obtained a multiple antimicrobial resistance index (IRMA)> 0.3. As for the formation of biofilms, 42.28% of the isolates produced in polystyrene plastic, 21.48% in stainless steel and 56.38% in silicone. As for the susceptibility of biofilm producers to iodine and chlorhexidine digluconate, these disinfectants were able to inhibit the formation of biofilm, but their effect was reduced in 25.40% of the samples after the formation of the mature biofilm. Genes related to biofilm production were detected, however *E. coli* common pilus genes showed a negative association with phenotypic production in the analyzed materials ($p<0.05$). Extra-intestinal *E. coli* genes have been found for adhesins, toxins, siderophores and serum resistance. No genes were found that correlated with diarrhogenic*E. coli* virulence factors. Before the results obtained, it is hoped to deepen the knowledge of this pathogen, in order to enable control strategies to improve the quality of milk in expansion tanks, aiming at public health.

Keywords: Antimicrobial multiresistance, bacteria, food safety, public health.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

É notória a preocupação mundial com a qualidade do leite oferecido para o consumo. A qualidade do leite é considerada muito boa em certos países desenvolvidos. Entretanto, no Brasil, apesar dos avanço sobtidos, boa parte do leite ainda é produzido aquém das condições de qualidade. As Instruções Normativas nº 76 e 77/2018 são as legislações vigentes que regulamentam a produção leiteira no país, garantindo a segurança desse alimento nas diferentes etapas da cadeia produtiva (BRASIL, 2018a, 2018b). A manutenção do leite produzido, em tanques refrigeradores, com temperatura até 4°C, limita a multiplicação de micro- organismos mesófilos e a produção de toxinas de psicrotróficos presentes no leite. Altas contagens bacterianas estão diretamente associadas a temperaturas superiores a 4,1°C, indicando falhas na higiene da ordenha (BUENO et al., 2004), ou, ainda, devido a ocorrência de mastites, sejam de origem contagiosa ou ambiental (LANGONI, 2013).

A presença de coliformes no leite, incluindo *Escherichia coli* de acordo com o limite estabelecido, garante a eficácia da inativação dos micro-organismos durante a pasteurização. No entanto, quando ocorrem falhas na pasteurização do leite, ou mesmo após o consumo do produto cru, os humanos podem ser expostos a riscos de doenças (GUH et al., 2010). A presença de *Escherichia coli* produtora de shiga toxina ou verotoxina (STEC/VTEC), responsável pela síndrome urêmica hemolítica e colite hemorrágica, tem sido relatada em isolados recuperados do leite de vacas armazenado em tanques de expansão (JAYARAO et al., 2006). Surtos de colite hemorrágica, causados pelo sorotipo *E. coli* O157:H7, tem sido relatados em queijo produzido com leite não pasteurizado (HONISH et al., 2014) ou pelo consumo de leite cru (KEENE et al., 2009). Certos isolados de *E. coli* são capazes de aderir, colonizar e formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, possibilitando a sobrevivência do patógeno em ambientes hostis (WANG et al., 2012a).

A produção da enzima β-lactamase de espectro extendido (ESBL) é considerada o principal fator de resistência das bactérias gram-negativas a fármacos β-lactâmicos. Essas enzimas, clavulanato suscetíveis mediada por plasmídeos, conferem as bactérias resistência as cefalosporinas de terceira e quarta gerações. Linhagens produtoras de ESBLs são reconhecidas como

problema de Saúde Pública, pela associação com surtos e altas taxas de morbimortalidade em humanos (POIREL; BONNIN; NORDMANN, 2012).

Estudos moleculares para identificação de *E. coli* em tanques de expansão são praticamente incipientes no Brasil, bem como o perfil clonal dos isolados. O aumento da resistência dos patógenos aos antimicrobianos, apontam para a premência de se investigar o perfil de sensibilidade de bactérias isoladasde leite de tanques de expansão. A comparação genotípica entre estirpes de *E. coli* pode possibilitar a identificação de grupos clonais distintos, norteando estudos de marcadores específicos dos fatores de virulência, sensibilidade e/ou resistência aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento da mastite em vacas na lactação ou no período seco. Ademais, pouca atenção tem sido despendida com a qualidade higiênico-sanitária do leite de tanques de resfriamento, bem como a pesquisa de bactérias formadoras de biofilme em tanques de expansão.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- Apresençadecepasresistentesadeterminadasclassesdeantimicrobianos pode estar associada com fármacos usualmente utilizados para tratamento de mastite nopaís;
- O alto número de isolados (36/149) com índice de multirresistência a antimicrobianos acima de 0,3 leva a uma preocupação quanto a emergência de patógenosmultiresistentes;
- A não identificação de cepas portadoras de ESBL ou de genes de formação do mesmo indicam que essa enzima não é um problema, pelo menos até o momento, nas propriedadesanalisadas;
- A formação de biofilme em diferentes materiais aponta a uma necessidade de adequada higienização de equipamentos, tanto nas propriedades como no ambienteindustrial;
- O uso de iodo e digluconato de clorexidina deve ser empregado dentro da periodicidade estabelecida, pois após a formação do biofilme maduro, isolados de *E. coli* podem não ser susceptíveis a esses agentes desinfetantes;
- Os genes associados a *E coli* common pilus tiveram uma associação negativa com a formação de biofilme nos diferentes materiais;
- Foram detectados genes associados a fatores de virulência em ExPEC nos isolados analisados;
- Nenhum dos isolados analisados apresentou genes associados a *E. coli* diarreiogênicas.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Heterogeneity in resistance to food-related stresses and biofilm formation ability among verocytotoxigenic Escherichia coli strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 3, p. 220–230, 2013.

ARANDA, K. R. S. et al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing Escherichia coli strains in Brazilian children. **FEMS Microbiology Letters**, v. 267, n. 2, p. 145–150, 2007.

ASKARI BADOUEI, M. et al. Molecular characterization of enterohemorrhagic Escherichia coli hemolysin gene (EHEC-hlyA)-harboring isolates from cattle reveals a diverse origin and hybrid diarrheagenic strains. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, p. 342–348, 2016.

AVELINO, F. et al. The majority of enteroaggregative Escherichia coli strains produce the E. coli common pilus when adhering to cultured epithelial cells. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 7, p. 440–448, 2010.

BIELASZEWSKA, M. et al. Characterisation of the Escherichia coli strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: A microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 671–676, 2011.

BRADFORD, P. Extended-spectrum ß-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933–951, 2001.

BRASIL. Decreto-lei nº 923, de 10 de outubro de 1969. **Diário Oficial da União**, 1969.

BRASIL. Decreto nº 66.183, de 5 de fevereiro de 1970. **Diário Oficial da União**, 1970.

BRASIL. Instrução normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, p. 1–8, 2018a.

BRASIL. Instrução normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, p. 1–8, 2018b.

BRASIL. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil: informe 2018.

Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde., p. 16, 2019.

BROMBACHER, E. et al. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in Eschericia coli. **Microbiology**, v. 149, n. 10, p. 2847–2857, 2003.

BROWN, M. R. W.; ALLISON, D. G.; GILBERT, P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics a growth-rate related effect? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 22, n. 6, p. 777–780, 1988.

BUENO, V. F. F. et al. Influência da temperatura de armazenamento e do sistema de utilização do tanque de expansão sobre a qualidade microbiológica do leite cru. **Hig. aliment**, v. 18, n. 124, p. 62–67, 2004.

CAMERON, M. et al. Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Milk yield and somatic cell count in the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 4, p. 2427–2436, 2015.

CAPPITELLI, F.; POLO, A.; VILLA, F. Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled. **Food Engineering Reviews**, v. 6, n. 1–2, p. 29–42, 2014.

CASTILHO, I. G. et al. Host-pathogen interactions in bovine mammary epithelial cells and HeLa cells by Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6414–6421, 2017.

CHAGNOT, C. et al. Colonization of the meat extracellular matrix proteins by O157 and non-O157 enterohemorrhagic Escherichia coli. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 92–98, 2014.

CHEN, X.; STEWART, P. S. Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction-diffusion interaction. **Environmental Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 2078–2083, 1996.

CHERIF-ANTAR, A. et al. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. **Dairy Science and Technology**, v. 96, n. 1, p. 27–38, 2016.

CLAEYS, W. L. et al. Raw or heated cow milk consumption : Review of risks and bene

fi ts. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 251–262, 2013.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** [s.l: s.n.].

COSTA, E. O. et al. Identification of the coagulase-negative staphylococci isolates from bovine mastitis and evaluation of the inflammatory. **Proc. XXV Jubilee World Buiatrics Congress. Alapította, Budapest, Hungary.**, p. 73, 1998.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microscopy**, v. 49, p. 711–745, 1995.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.

CZECZULIN, J. R. et al. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent Escherichia coli. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 6, p. 2692–2699, 1999.

DAHLBERG, S. et al. Review Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. **Cell Host and Microbe**, 2009.

DE FREITAS GUIMARÃES, F. et al. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2866–2872, 2013.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–189, 2002.

EWERS, C. et al. Molecular epidemiology of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 104, n. 1–2, p. 91–101, 2004.

EWERS, C. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: How closely related are they? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 3, p. 163–176, 2007.

FAGUNDES, H.; FERNANDES OLIVEIRA, C. A. Infecções intramamárias causadas por Staphylococcus aureus e suas implicações em paúde pública Staphylococcus aureus intramammary infections and its implications in public health -REVISÃO

BIBLIOGRÁFICA. **Ciência Rural**, v. 34434, n. 4, p. 1315–1320, 2004.

FARFAN, M. J.; TORRES, A. G. Molecular mechanisms that mediate colonization of shiga toxin-producing Escherichia coli strains. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 3, p. 903–913, 2012.

FERNÁNDEZ, L. A.; BERENGUER, J. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 21–44, 2000.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 210–230, 1989.

GARÉNAUX, A.; CAZA, M.; DOZOIS, C. M. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic Escherichia coli. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 89–98, 2011.

GHUYSEN, J.-M. Serine ß-Lactamases and penicillin-binding proteins. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 45, p. 37–97, 1991.

GIBSON, H. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 1, p. 41–48, 1999.

GOETZ, C. et al. Coagulase-negative staphylococci species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6454–6464, 2017.

GUH, A. et al. Outbreak of Escherichia coli O157 Associated with Raw Milk , Connecticut , 2008. v. 30329, n. 12, p. 1411–1417, 2010.

HAMMAD, A. M. et al. First Characterization and Emergence of SHV-60 in Raw Milk of a Healthy Cow in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 11, p. 1269–1272, 2008.

HERNANDES, R. T. et al. Fimbrial Adhesins Produced by Atypical Enteropathogenic Escherichia coli Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8391–8399, 2011.

HERRERO, M.; DE LORENZO, V.; NEILANDS, J. B. Nucleotide sequence of the iucD

gene of the pCoIV-K30 aerobactin operon and topology of its product studied with phoA and lacZ gene fusions. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 1, p. 56–64, 1988.

HONISH, L. et al. An Outbreak of E . coli O157 : H7 Hemorrhagic Colitis Associated with Unpasteurized Gouda Cheese. **Canadian Journal of Public Health**, v. 96, n. 3, p. 182–184, 2014.

HUANG, S. H. et al. Escherichia coli invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo: Molecular cloning and characterization of invasion gene ibe10. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4470–4475, 1995.

ISHIDA, H. et al. In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm- producing Pseudomonas aeruginosa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 7, p. 1641–1645, 1998.

JAYARAO, B. M. et al. A Survey of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk and Raw Milk Consumption Among Farm Families in Pennsylvania. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2451–2458, 2006.

JAYARAO, B. M.; HENNING, D. R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 10, p. 2157–2162, 2001.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 80–128, 1991.

JOHNSON, J. R. et al. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, iha and iroN(E. coli), among Escherichia coli isolates from patients with urosepsis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 3040–3047, 2000a.

JOHNSON, J. R. et al. Evidence of commonality between canine and human extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains that express papG allele III. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3327–3336, 2000b.

JOHNSON, J. R. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 17, n. 2, p. 261–278, 2003.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended Virulence Genotypes of Escherichia coli

Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 261–272, 2000.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.

KASNOWSKI, M. et al. Biofilm formation in the food industry and surface validation methods. **Electronic Journal of Veterinary Medicine**, v. 15, p. 1–23, 2010.

KEENE, W. E. et al. A Prolonged Outbreak of Escherichia coli O157:H7 Infections Caused by Commercially Distributed Raw Milk . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 3, p. 815–818, 2009.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of Escherichia coli to identify high-risk sources of fecal contamination of foods . Multiple Antibiotic Resistance Indexing of Escherichia coli to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foodst. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 165–170, 1983.

LANGONI, H. et al. Cultivo microbiológico e a sensibilidade no isolamento de patógenos nas mastites bovinas. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 4, p. 708–715, 2009.

LANGONI, H. Qualidade do leite: Utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 620–626, 2013.

LANGONI, H. et al. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1261–1269, 2017.

LE BOUGUENEC, C.; ARCHAMBAUD, M.; LABIGNE, A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic Escherichia coli strains by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 1189–1193, 1992.

LEE, S. H. I. et al. Biofilm-producing ability of Staphylococcus aureus isolates from Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1812–1816, 2014.

LEJEUNE, J. T. et al. Longitudinal Study of Fecal Shedding of Escherichia coli

O157:H7 in Feedlot Cattle: Predominance and Persistence of Specific Clonal Types despite Massive Cattle Population Turnover. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 377–384, 2004.

LEONEL GONÇALVES, J. et al. Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against Prototheca zopfii isolates from bovine subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3613–3621, 2015.

LIU, X. et al. Resistance of biofilms to the catalase inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 2, p. 156–162, 1998.

MAROUANI-GADRI, N. et al. Potential of Escherichia coli O157:H7 to persist and form viable but non-culturable cells on a food-contact surface subjected to cycles of soiling and chemical treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 96–103, 2010.

MILANOV, D. et al. Investigation of biofilm formation and phylogenetic typing of Escherichia coli strains isolated from milk of cows with mastitis. **Acta Veterinaria**, v. 65, n. 2, p. 202–216, 2015.

NAM, H. M. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 2020–2026, 2009a.

NAM, H. M. et al. Antimicrobial resistance of enterococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 7–8, p. 698–701, 2009b.

NEILANDS, J. B. **SiderophoresArchives of Biochemistry and Biophysics**, 1993.

NERO, L. A.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M. M. S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão – PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 21, 2003.

NÓBREGA, D. B. et al. Molecular epidemiology and extended-spectrum β -lactamases production of. **Pesq. Vet. Bras**, v. 33, n. 7, p. 855–859, 2013.

OLIVER, S. P. et al. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 7, p. 793–806, 2009.

OOSTERIK, L. H. et al. Effect of serogroup, surface material and disinfectant on biofilm formation by avian pathogenic Escherichia coli. **Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 561–565, 2014.

PATERSON, D. L. et al. Bloodstream Isolates from Seven Countries : Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type ␣ -Lactamases. **Society**, v. 47, n. 11, p. 3554–3560, 2003.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of shiga toxigenic escherichia coli by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic E. coli hlyA, rfb(O111), and rfb(O157). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 598–602, 1998.

PFALLER, M. A.; SEGRETI, J. Overview of the Epidemiological Profileand Laboratory Detection of Extended-Spectrum β-Lactamases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. Supplement_4, p. S153–S163, 2006.

POIREL, L.; BONNIN, R. A.; NORDMANN, P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β-lactamases in Gram-negative rods. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 5, p. 883–893, 2012.

POUTTU, R. et al. matB, a common fimbrillin gene of Escherichia coli, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 16, p. 4727–4736, 2001.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 285–293, 1998.

RAJALA-SCHULTZ, P. J. et al. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Veterinary Microbiology**, v. 102, n. 1–2, p. 33–42, 2004.

RAYMUNDO, N. K. L.; BERSOT, L. DOS S.; OSAKI, S. C. Consumer profile and problems associated with uninspected raw milk consumption in western Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, n. 0, p. 1–8, 2018.

RENDÓN, M. A. et al. Commensal and pathogenic Escherichia coli use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, n. 25, p. 10637–10642, 2007.

RIBEIRO, M. G. et al. Peracute bovine mastitis caused by Klebsiella pneumoniae. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 485–488, 2008.

RIBEIRO, M. G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. **Manual de terapêutica veterinária**, v. 3, p. 759–771, 2008.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E. et al. Characterizing the APEC pathotype. **Veterinary Research**, v. 36, n. 2, p. 241–256, 2005.

ROESCH, M. et al. Comparison of Antibiotic Resistance of Udder Pathogens in Dairy Cows Kept on Organic and on Conventional Farms. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 989–997, 2006.

RYU, J.-H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm formation by Escherichia coli O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 1, p. 247–54, 2005.

SÁ, M. E. P. DE et al. Importância do Staphylococcus aureus nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 320–326, 2004.

SALDAÑA, Z. et al. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing Escherichia coli and identification of Fis as a negative regulator of curli. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 992–1006, 2009.

SCALETSKY, I. C. A. et al. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic Escherichia coli strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3756–3759, 2009.

SCHMIDT, H. et al. Development of PCR for screening of enteroaggregative Escherichia coli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 701–705, 1995.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded

hemolysin of Escherichia coli O157:H7 strain EDL 933. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 3, p. 1055–1061, 1995.

SHARMA, M.; ANAND, S. K.; PRASAD, D. N. In vitro propagation of mixed species biofilms using online consortia for dairy processing lines. **Milchwissenschaft**, v. 58, n. 5–6, p. 270–274, 2003.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes to stainless steel, rubber and polytetrafluorehtylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 439–447, 2000.

SOMERS, E. B.; LEE WONG, A. C. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on Listeria monocytogenes biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 10, p. 2218–2229, 2004.

STATHOPOULOS, C. Structural features, physiological roles, and biotechnological applications of the membrane proteases of the OmpT bacterial endopeptidase family: a micro-review. **Membrane & cell biology**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 1998.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.

STEWART, P. S.; RAQUEPAS, J. B. IMPLICATIONS OF REACTION-DIFFUSION THEORY FOR THE DISINFECTION OF MICROBIAL BIOFILMS BY REACTIVE ANTIMICROBIAL AGENTS. **Chemical Engineering Science**, v. 50, n. 19, p. 3099–3104, 1995.

STICKLER, D.; HEWETT, P. Activity of antiseptics against Escherichia coli growing as biofilms on silicone surfaces. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, p. 974–978, 1989.

STRALEY, B. A. et al. Gram-Negative Bacteria in Raw Bulk Tank Milk. v. 3, n. 3, p. 222–233, 2006.

TENNANT, S. M. et al. Characterisation of atypical enteropathogenic E. coli strains of clinical origin. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1–11, 2009.

TOLLEFSON, L.; FLYNN, W. T. Impact of antimicrobial resistance on regulatory policies in veterinary medicine: Status report. **AAPS PharmSci**, v. 4, n. 4, p. 1–2, 2002.

TOMA, C. et al. Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic Escherichia coli. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2669–2671, 2003.

TÓTH, I. et al. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic Escherichia coli strains isolated from human and animal sources: Establishment of the existence of a new cdt variant (type IV). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4285–4291, 2003.

TRABULSI, L. R.; ORDOÑEZ, J.; MARTINEZ, M. Enterobacteriaceae. In: Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 4ª Edição. **Editora Atheneu**, p. 269–276, 2005.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5–6, p. 626–633, 2005.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117–1131, 2010.

VAN KESSEL, J. S. et al. Prevalence of salmonellae, Listeria monocytogenes, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 2822–2830, 2004.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, n. 1–2, p. 179–185, 2003.

WANG, R. et al. Biofilm Formation by Shiga Toxin–Producing Escherichia coli O157:H7 and Non-O157 Strains and Their Tolerance to Sanitizers Commonly Used in the Food Processing Environment. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 8, p. 1418–1428, 2012a.

WANG, R. et al. Inhibition of escherichia coli and proteus mirabilis adhesion and biofilm formation on medical grade silicone surface. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 336–345, 2012b.

XICOHTENCATL-CORTES, J. et al. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 11, p. 3519–3529, 2007.

YAMAMOTO, S. et al. Detection of urovirulence factors in Escherichia coli by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 85–90, 1995.

YE, Y. et al. Inactivation of Cronobacter malonaticus cells and inhibition of its biofilm formation exposed to hydrogen peroxide stress. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 66–74, 2018.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry-Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125–148, 1994.