



FORMADORES DE BIOFILME DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA NA ÁGUA POTÁVEL

ARTIGO ORIGINAL

CAVALCANTE, Luzia Angélica Alves¹, ANDRADE, Jéssica Martins de², SILVA, Maria Goretti Varejão da³, MEDEIROS, Anna Karolyne de Araujo⁴, CORDEIRO, Geovania de Souza⁵, SILVA, Daniel Dias da⁶, SOARES, Karla Danielle Almeida⁷, MOURA, Vilton Edson Figueiroa de⁸, SOARES, Anísio Francisco⁹, MEDEIROS, Elizabeth Sampaio de¹⁰

CAVALCANTE, Luzia Angélica Alves. *et al.* **Formadores de biofilme de Pseudomonas aeruginosa na água potável.** Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 08, Ed. 09, Vol. 01, pp. 17-29. Setembro de 2023. ISSN: 2448-0959, Link de acesso: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/veterinaria/biofilme-de-pseudomonas-aeruginosa>, DOI: 10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/veterinaria/biofilme-de-pseudomonas-aeruginosa

RESUMO

Atualmente, tem-se observado um aumento na demanda por água engarrafada, devido à insatisfação da população com a qualidade da água fornecida pelos órgãos públicos. O presente estudo buscou avaliar a presença de *P. aeruginosa* formadora de biofilme em água potável engarrafada. Foram selecionadas trinta e cinco amostras típicas de água engarrafada para identificar a presença de *P. aeruginosa* e sua capacidade de formar biofilme bacteriano. A metodologia usada para verificar a presença de *P. aeruginosa* seguiu a técnica do tubo múltiplo e a avaliação da capacidade de formação de biofilme seguiu a técnica de microdiluição, com a leitura da capacidade óptica por espectrofotometria a 620 nm. A presença de *P. aeruginosa* foi detectada em 26% das amostras analisadas, representando nove das 35 amostras testadas. Dessas, 55% tinham a capacidade de formar biofilme. O presente estudo mostra que a presença de *P. aeruginosa*, capaz de formar biofilmes, é um fator de risco para a saúde pública devido à ampla comercialização de água engarrafada.

Palavras-chave: Aderência bacteriana, Técnicas microbiológicas, Indústria de embalagens.



INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil tem observado um aumento constante na demanda por água engarrafada devido à falta de capacidade dos sistemas de abastecimento público em fornecer água de qualidade e quantidade adequadas (BRANDÃO *et al.*, 2012). Embora este produto associe à sua imagem uma condição de pureza e segurança sanitária, a ocorrência de surtos gastrointestinais devido ao consumo dessas águas tem direcionado a atenção dos pesquisadores para seu estudo, especialmente no que se refere ao seu padrão microbiológico (COSTA *et al.*, 2015; WIELAND *et al.*, 2018).

Novello *et al.*, (2020) afirmam que o rápido crescimento microbiano após o envase pode estar relacionado à oxigenação da água, ao aumento da temperatura durante o armazenamento e aos nutrientes presentes na superfície da embalagem. Observou-se que este produto não é necessariamente seguro e pode representar riscos à saúde dos consumidores, como agravamento por patógenos oportunistas, como *Pseudomonas aeruginosa*. Essa bactéria, devido à sua alta resistência à terapia antimicrobiana, está associada a infecções crônicas persistentes, afetando principalmente indivíduos imunocomprometidos (REIS *et al.*, 2014; NOVELLO *et al.*, 2020).

A contaminação dessas águas com *P. aeruginosa* durante o processo de envase pode ocorrer devido à capacidade dessa bactéria de formar biofilmes nas embalagens retornáveis e equipamentos da planta, sendo essa propriedade considerada um dos principais fatores de virulência atribuídos ao *P. aeruginosa* (PEDROSA *et al.*, 2014).

A ampla distribuição e o consumo dessas águas entre a população tornam o monitoramento desse produto relevante. *P. aeruginosa* é um dos critérios microbiológicos definidos na legislação atual para água engarrafada, mas não há exigência de investigar a capacidade desse microrganismo de formar biofilmes. Essa pesquisa teria um impacto significativo, principalmente na água engarrafada, já que o processo de engarrafamento é propício ao desenvolvimento dessas estruturas



biológicas. Portanto, reconhecendo a necessidade desta pesquisa, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de *P. aeruginosa* formadora de biofilme em água potável engarrafada.

METODOLOGIA

AS AMOSTRAS

Entre os meses de novembro de 2019 e setembro de 2020, foram separadas e analisadas 35 amostras de água engarrafada não carbonatada comercializadas em garrafas retornáveis de 20 litros de 21 marcas diferentes (codificadas pelas letras "A" a "U"). Cada amostra representativa era composta por 5 unidades do mesmo lote/data de envase, a fim de cumprir os parâmetros de amostragem da RDC ANVISA nº 275 de 22/09/2005 (Brasil, 2005), ainda em vigor durante o período de análise deste estudo, totalizando 175 garrafas. Foram analisadas nove amostras da marca "D", três das marcas "H e I", duas das marcas "B e C" e uma das marcas "A, E, F, G, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T e U". As amostras foram provenientes do "Programa de Monitoramento de Água Envasada" da Agência Pernambucana de Vigilância Sanitária (APEVISA) e do Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE). As amostras foram selecionadas de acordo com a quantidade recebida do "Programa de Monitoramento de Água Envasada" da APEVISA e LACEN.

A pesquisa foi desenvolvida em duas fases: Pesquisa sobre *P. aeruginosa* em amostras de água engarrafada no Laboratório de Microbiologia de Água e Alimentos (Coordenação de Vigilância Laboratorial em Bromatologia - LACEN/PE); Análise da formação de biofilme por *P. aeruginosa* isolada de amostras de água engarrafada no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (Departamento de Medicina Veterinária/Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE).

DETERMINAÇÃO DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

O teste para *P. aeruginosa* nas amostras de água foi realizado usando a técnica de tubo múltiplo recomendada pela *American Public Health Association* (APHA) (APHA,



2017), que inclui uma fase presuntiva e confirmatória. A amostra foi primeiro preparada homogeneizando-a, agitando o frasco 25 vezes a um ângulo de 45°. Na fase presuntiva, foi utilizado caldo de asparagina estéril em concentrações simples e duplas com três séries de diluição (base 10), cada série consistindo em cinco tubos. Após incubação a 36°C por 48 horas, um pigmento verde fluorescente no tubo da amostra examinado sob luz ultravioleta de onda longa (365 nm) em um ambiente escuro foi considerado um teste presuntivo positivo. A fase confirmatória foi realizada inoculando-se a cultura dos tubos positivos da primeira fase em caldo de acetamida estéril. O teste é baseado na capacidade das bactérias de produzir amônia e ácido acético a partir da acetamida e na alteração do pH do meio, com resultado positivo para *P. aeruginosa* indicado por uma mudança de laranja para roxo (presença de pH alcalino) dentro de 4 a 7 dias de incubação a 36°C.

1. Foram utilizadas *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 como controles positivo e negativo, respectivamente, em ambas as fases. O número de tubos positivos foi calculado e analisado utilizando a tabela de número mais provável (NMP) com cinco tubos por diluição (10 mL, 1,0 mL e 0,1 mL) (APHA, 2017).

ISOLAMENTO DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Os tubos de caldo de acetamida que apresentavam coloração roxa foram semeados em ágar cetrimide pela técnica de depleção e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Foi selecionada uma colônia isolada produtora de pigmento verde de cada amostra. As colônias foram semeadas em ágar nutriente para serem coletadas para análise da capacidade de produção de biofilme.

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOFILME

Para avaliar a produção de biofilme, foi utilizada a metodologia de Andrade (2018) com adaptações, onde colônias isoladas de *P. aeruginosa* foram inoculadas em tubos contendo 3 mL de caldo BHI até uma turbidez de McFarland de 0,5 e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após essa etapa, 100 µL da solução foram



inoculados com uma micropipeta automatizada em placas de microdiluição de 96 poços e incubados a 37°C por 24 horas. Após esse tempo, o conteúdo de cada poço foi aspirado suavemente com uma micropipeta automática e lavado três vezes com água destilada estéril. As placas foram deixadas secar à temperatura ambiente, e as células aderentes foram coradas com 200 µL de violeta de genciana a 0,25%. Após 5 minutos da aplicação do corante, os poços foram lavados e secos à temperatura ambiente, conforme descrito anteriormente. Em seguida, foram adicionados 200 µL de álcool:acetona 80:20. Caldo BHI foi usado como controle negativo e *P. aeruginosa* ATCC® 27853 foi usado como controle positivo em triplicata. A densidade óptica (DO) dos poços foi lida por espectrofotometria a 620 nm. Para classificar os isolados quanto à produção de biofilme, a média da densidade óptica (DO) do controle negativo (DOCN) foi medida e comparada com a média da DO dos isolados (DOIS), sendo classificados como: negativos (DOIS<DOCN); fracos (DOCN<DOIS<2.DO CN); moderados (2.DO CN<DOIS<4.DO CN); fortes (4.DO CN<DOIS) formadores de biofilme.

ANÁLISE DE DADOS

Foi utilizada análise estatística descritiva para determinar as frequências absoluta e relativa dos espécimes positivos em relação ao número total de espécimes coletados (SAMPAIO, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 35 amostras representativas de água engarrafada analisadas, 24 amostras (69%) foram tipificadas como água mineral natural (AMN) e 11 amostras (31%) como água com sais adicionados (ASA).

Tabela 1. Mesorregiões de origem das amostras de Pernambuco com respectivas quantidades

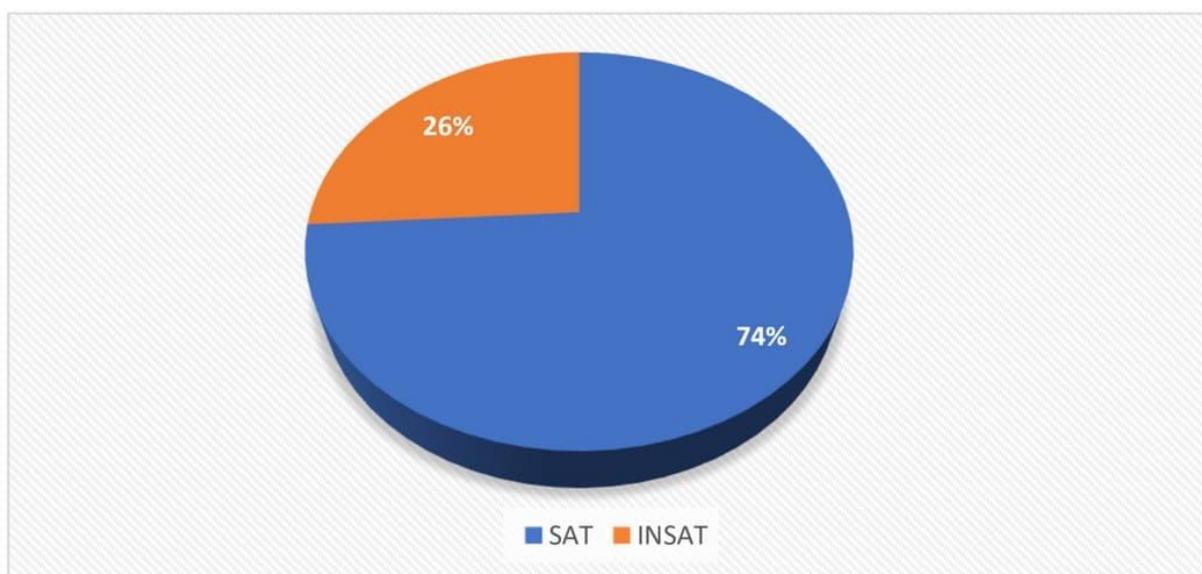
Mesorregiões	Quantidade
MRR	29
Agreste	2

Sertão	2
Zona da Mata	1

Fonte: Dados obtidos a partir da pesquisa realizada pelos autores, 2023.

A Tabela 1 mostra as mesorregiões de Pernambuco de origem das amostras processadas com as respectivas quantidades. Pode-se observar que a maioria das amostras provém da Região Metropolitana do Recife (RMR). A predominância da amostragem nessa mesorregião pode estar relacionada à concentração de plantas de engarrafamento. Além disso, devido à proximidade geográfica, as amostras desses envasadores alcançam os consumidores em toda a RMR, a mesorregião mais populosa de Pernambuco (IBGE, 2020), fator relevante para fins de monitoramento da vigilância em saúde.

Figura 1. Distribuição percentual de amostras satisfatórias (SAT) e insatisfatórias (INSAT) em relação à presença de *P. aeruginosa*, de acordo com a RDC nº 275/05 - ANVISA/MS



Fonte: Dados obtidos a partir da pesquisa realizada pelos autores, 2023.

A Figura 1 mostra que 26% (9/35) das amostras analisadas foram consideradas insatisfatórias para *P. aeruginosa*, de acordo com os critérios de aprovação/reprovação definidos pela RDC ANVISA nº 275/2005 (BRASIL, 2005). Essa resolução especifica que o lote é rejeitado se contiver uma contagem dessa



bactéria em qualquer uma das unidades da amostra representativa, superior a 2,2 MPN/100 mL, ou quando a contagem de *P. aeruginosa* em mais de uma unidade da amostra representativa for superior a 1,1 MPN/100 mL.

Considerando as amostras insatisfatórias, a Tabela 2 apresenta os níveis de *P. aeruginosa* (MPN/100mL) por unidade de amostra. É importante destacar que todas as amostras nas quais foi verificada a presença desse microorganismo tinham quantidade suficiente para rejeitar as amostras de acordo com o padrão microbiológico para água engarrafada. Foi também demonstrado que entre as amostras insatisfatórias para o parâmetro de *P. aeruginosa*, cinco foram classificadas como água mineral natural e quatro como água com sais adicionados. A presença de *P. aeruginosa* em água com sais adicionados em quantidades que a tornam imprópria para consumo indica a importância de incluir outros parâmetros microbiológicos para esse tipo de água engarrafada, além dos definidos no período da pesquisa pela RDC ANVISA Nº182/2017 (BRASIL, 2017). No entanto, Pernambuco se encontra em posição de referência em relação a essa resolução nacional, pois possui legislação própria para água com sais adicionados, a Lei Estadual Nº 15.859/2016 (PERNAMBUCO, 2016), que adota como padrão microbiológico para esse produto o mesmo definido na RDC ANVISA nº 275/2005 (BRASIL, 2005).

Tabela 2. Quantidades de *P. aeruginosa* detectadas em amostras de água engarrafada pela técnica do número mais provável (NMP/100 mL), por unidade analítica

Amostra (marca/número)	Unidade Analítica	Quantitativo (MPN/100 mL)
B2	1	41
	2	79
	3	< 1,8
	4	< 1,8
	5	< 1,8
D5	1	22
	2	< 1,8
	3	< 1,8
	4	920



	5	26
D9	1	< 1,8
	2	< 1,8
	3	21
	4	< 1,8
	5	< 1,8
J14	1	2
	2	< 1,8
	3	< 1,8
	4	4,5
	5	< 1,8
D16	1	130
	2	350
	3	350
	4	220
	5	920
L17	1	< 1,8
	2	6,1
	3	< 1,8
	4	4,5
	5	< 1,8
D20	1	34
	2	1600
	3	34
	4	21
	5	< 1,8
I23	1	< 1,8
	2	2
	3	< 1,8
	4	2
	5	< 1,8
O27	1	< 1,8



	2	2
	3	2
	4	< 1,8
	5	< 1,8

Fonte: Dados obtidos a partir da pesquisa realizada pelos autores, 2023.

Corroborando os achados deste estudo, um estudo de Brandão *et al.* (2012), com 31 amostras de água engarrafada em garrafas de 20 litros retornáveis, encontrou que 17 amostras apresentavam contagens acima do limite estabelecido para *P. aeruginosa*. De forma semelhante, Coelho *et al.* (2010), ao avaliar a qualidade microbiológica das águas minerais consumidas na região metropolitana do Recife, encontraram a presença de *Pseudomonas spp.* em 24 amostras (20,00%), enquanto *P. aeruginosa* foi positiva em 22 amostras (18,33%), encontradas em todas as dez marcas analisadas.

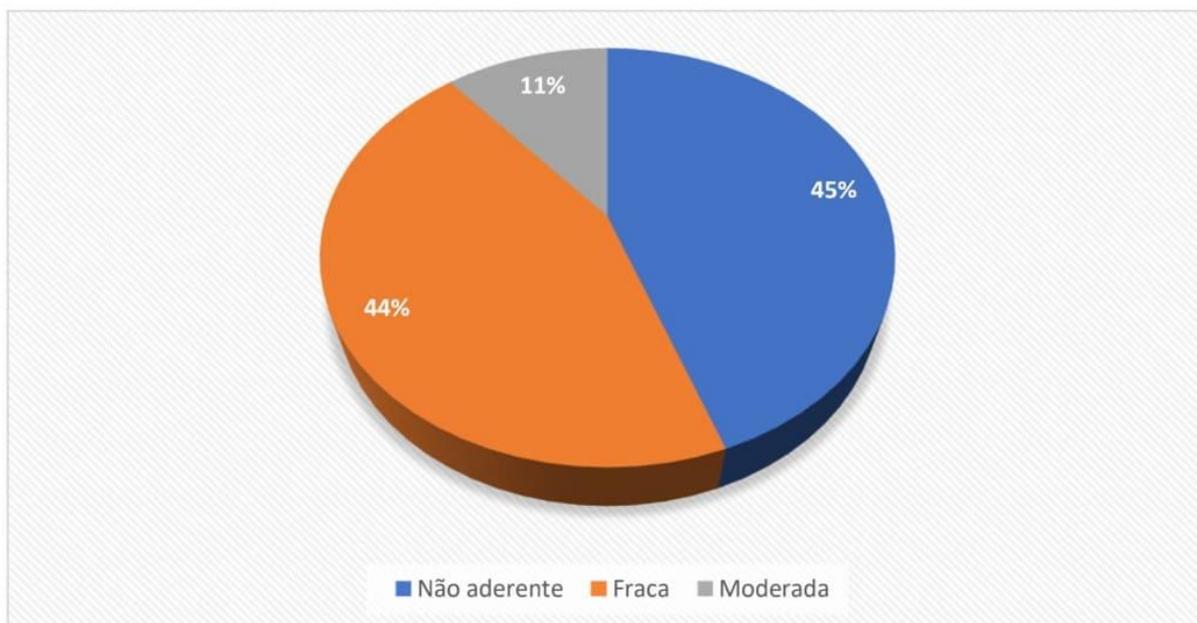
Em outros países, estudos também verificaram a positividade desse microorganismo na água engarrafada. Em um estudo amplo (2.500 amostras) na Bulgária, Georgieva e Dimitrova (2016) encontraram esse agente em 274 amostras de água engarrafada analisadas, levando os autores a questionar a qualidade desse produto para grupos com imunidade comprometida. Em um estudo de Herath (2014), 36 marcas de água engarrafada de toda a ilha do Sri Lanka foram submetidas à determinação de *P. aeruginosa*, e constatou-se que 18 (50%) marcas apresentaram a presença desse microorganismo, sendo relatado que esses achados se devem a um tratamento UV inadequado, filtros entupidos e contaminação cruzada, ou ao uso de água de fonte inadequada para o engarrafamento.

Kouchesfahani *et al.* (2015), ao investigar *P. aeruginosa* em água engarrafada vendida nos mercados iranianos, detectaram esse microorganismo em 36,7% de todas as amostras testadas. Esses autores observam que, contrariamente à opinião pública, a água engarrafada não está isenta de microorganismos e sugerem que as autoridades devem fornecer um plano de monitoramento e controle mais rigoroso.

Diante dos resultados obtidos neste estudo, há congruência com os dados já publicados pelos autores mencionados anteriormente quanto à presença desse microorganismo em quantidades significativas, sendo essa ocorrência predominante quando o envase é feito em recipientes reutilizáveis, assim como concordância quanto aos prováveis fatores que levam a essa contaminação: falhas nas boas práticas de fabricação (BPF) durante o enchimento e armazenamento, bem como a lavagem e desinfecção inadequadas das garrafas reutilizáveis, que facilitam a formação de biofilmes por *P. aeruginosa*.

A produção de biofilmes é uma característica dessas bactérias e, nesta pesquisa, também tentamos avaliar os isolados encontrados em termos de sua capacidade de formar biofilmes (CFB) (Figura 2).

Figura 2: Distribuição percentual de amostras positivas para *P. aeruginosa* de acordo com sua CFB



Fonte: Dados obtidos a partir da pesquisa realizada pelos autores, 2023.

Os resultados coletados mostram que, dos isolados de *P. aeruginosa* testados para produção de biofilme, 55% foram caracterizados como formadores de biofilme, classificados entre fracos e moderados em termos de capacidade de formação de biofilme (CFB). Alguns autores também apresentaram percentagens significativas de



formação de biofilme por *P. aeruginosa* em águas engarrafadas em suas pesquisas. Pedrosa *et al.* (2014) encontraram que, dos 31 isolados de *P. aeruginosa* encontrados em amostras de água mineral natural, 48% mostraram CFB moderado a forte, e 51% estavam entre não aderentes e fracamente aderentes.

Bernardo (2009) descreve a classificação de isolados de *P. aeruginosa* a partir de amostras de água mineral com relação à produção de biofilme, onde 52,9% das cepas foram classificadas como fortemente aderentes, 41,2% das cepas isoladas como moderadamente aderentes e 5,9% como fracamente aderentes.

Quando Rojas *et al.* (2014) avaliaram a CFB em cepas de *P. aeruginosa* isoladas de amostras de água engarrafada, descobriram que tinham uma habilidade moderada para formar biofilme. A importância de estudar os biofilmes nesses isolados é evidente, considerando que provêm de um produto cuja embalagem tende a colaborar com a formação dessas estruturas biológicas, especialmente quando se trata de embalagens reutilizáveis, que requerem um padrão higiênico estrito e são altamente suscetíveis a falhas.

Analisando os resultados deste estudo e os outros mencionados acima sobre a ocorrência dessa bactéria em água engarrafada e sua capacidade de formar biofilme, podemos perceber a relevância das ações de vigilância laboratorial nesse produto, bem como a existência de instrumentos legais que as subsidiem. As regulamentações atuais estabelecem limites para *P. aeruginosa* em água engarrafada, mas não incluem testes de CFB dos isolados encontrados. Essa inclusão possibilitaria avaliar o grau de patogenicidade do *P. aeruginosa* encontrado, o que poderia ser um fator agravante na violação à saúde.

Considerando que *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista, que apresenta grande resistência a grupos antimicrobianos (Pires *et al.*, 2009), sua ocorrência representa um risco real para a saúde pública.



CONSIDERAÇÕES

A ocorrência de *P. aeruginosa* em água engarrafada consumida no Estado de Pernambuco, e as cepas encontradas foram caracterizadas como formadoras de biofilme, são fatores de virulência de grande importância para a saúde pública. Diante das implicações clínicas dessa bactéria, o uso de água engarrafada contaminada com *P. aeruginosa* põe em perigo a saúde dos consumidores, especialmente aqueles com sistemas imunológicos comprometidos. A ampla comercialização dessas águas observada nos últimos anos no Estado de Pernambuco, somada ao potencial patogênico dessa bactéria, torna preponderantes ações contínuas de controle sobre este produto, visando a um trabalho de vigilância sanitária mais eficiente nas indústrias de envase, que busque erradicar este microrganismo e a consequente formação de seu biofilme durante o processo de engarrafamento.

REFERÊNCIAS

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23 ed., Washington, D.C.: APHA, 2017.

ANDRADE, J. M. **Listeria monocytogenes formadoras de biofilme em presuntos fatiados e sua sensibilidade aos sanitizantes**, 2018. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

BERNARDO, S. P. C. **Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos e formação de biofilmes em Pseudomonas aeruginosa isoladas de água mineral**, 2009. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

BRANDÃO, M. L. L. *et al.* Comparação das técnicas do número mais provável (NMP) e de filtração em membrana na avaliação da qualidade microbiológica de água mineral natural. **Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo**, v. 71, n. 1, p. 32-39, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução - RDC nº 182, de 16 de outubro de 2017**. Dispõe sobre as boas práticas para industrialização, distribuição e comercialização de água adicionada de sais. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 16 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução - RDC nº 275, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 22 set. 2005.



COELHO, M. I. S. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 32, n. 1, p. 1-8, 2010.

COSTA, D. *et al.* Nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* associated with a drinking water fountain. **Journal of Hospital Infection**, v. 91, n. 3, p. 271-274, 2015.

GEORGIEVA, V.; DIMITROVA, Y. Study of the Microbiological Quality of Bulgarian Bottled Water in Terms of Its Contamination with *Pseudomonas aeruginosa*. **Central European journal of public health**, v. 24, n. 4, p. 326-330, 2016.

HERATH, A. T. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* in bottled drinking water in Sri Lanka: a potential health hazard. **Water Supply**, v. 14, n. 6, p. 1045-1050, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Estimativas da população residente para os municípios e para as unidades da federação brasileiros com data de referência em 1º de julho de 2020**. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/bibliotecacatalogo?view=detalhes&id=2101747>. Acesso em: 02 maio 2023.

KOUCHESFAHANI, M. M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* and Heterotrophic Bacteria Count in Bottled Waters in Iran. **Iranian Journal of Public Health**, v. 44, n. 11, p. 1514-1519, 2015.

NOVELLO, J. *et al.* Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water by DP1 bacteriophage immobilized on ethylene-vinyl acetate copolymer used as seal caps of plastic bottles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 35, p. 1-8, 2020.

PEDROSA, A. P. *et al.* Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. **Revista Ambiente & Água**, v. 9, n. 2, p. 313-324, 2014.

PERNAMBUCO. **Lei Estadual nº 15.859, de 30 de junho de 2016**. Dispõe sobre as condições sanitárias relativas à industrialização, distribuição e comercialização de água adicionada de sais no Estado de Pernambuco e dá outras providências. Recife: Assembleia Legislativa do Estado de Pernambuco, 2016.

PIRES, E. J. V. C. *et al.* Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Rev Bras Ter Intensiva**. v. 21, n. 4, p. 384-390, 2009. DOI: 10.1590/S0103-507X2009000400008.

REIS, L. R.; BEVILACQUA, P. D.; CARMO, R. F. Água envasada: qualidade microbiológica e percepção dos consumidores no município de Viçosa (MG). **Cadernos saúde coletiva**, v. 22, n. 3, p. 224-232, 2014.



ROJAS, T. *et al.* Bacilos gramnegativos no fermentadores en agua embotellada: susceptibilidad antimicrobiana y formación de biopelículas. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 34, n. 2, p. 64-69, 2014.

SAMPAIO, I. B. M. S. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 1998.

WIELAND, K.; CHHATWAL, P.; VONBERG, R. P. Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a systematic review. **American journal of infection control**, v. 46, n. 6, p. 643-648, 2018.

Enviado: 3 de julho, 2023.

Aprovado: 23 de agosto, 2023.

¹ Mestre em Biosciência Animal. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0833-7201>. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0965196379965915>.

² Doutor em Biosciência Animal. ORCID: 0000-0002-2871-6655. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3276511555193502>.

³ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biosciência Animal. ORCID: 0000-0001-9410-7631. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4532231119888940>.

⁴ Graduando em Medicina Veterinária. ORCID: 0000-0001-9273-5204. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8329028352662293>.

⁵ Graduando em Medicina Veterinária. ORCID: 0000-0001-5584-9464. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1495170820726310>.

⁶ Mestre em Biosciência Animal. ORCID: 0000-0002-4913-8313. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4967459162060058>.

⁷ Doutor em Biosciência Animal pela UFRPE. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2473-9451>. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5770903127454350>.

⁸ Graduando em Ciências Biológicas. ORCID: 0000-0001-7149-4931. Currículo Lattes: <https://lattes.cnpq.br/2928291078391850>.

⁹ Doutor em Bioquímica e Fisiologia, Mestre em Fisiologia, Biólogo. ORCID: 0000-0003-1493-7964. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9044747136928972>.

¹⁰ Orientador. Doutor do Programa de Pós-Graduação em Biosciência Animal. ORCID: 0000-0002-1289-2902. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5998863169551704>.