



Raquel Alexandra Fernandes Teixeira

Prevalência do *S. aureus* resistente à meticilina numa Superfície Alimentar da Guarda

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Francisco José Barbas Rodrigues e pela Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro P. Salgueiro Silva Couto e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Raquel Alexandra Fernandes Teixeira

Prevalência do *S. aureus* resistente à meticilina numa Superfície Alimentar da Guarda

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Francisco José Barbas Rodrigues e pela Professora Doutora Lígia Maria Ribeiro P. Salgueiro Silva Couto e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Na reta final deste projeto gostava de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para eu estar aqui.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por todos os conteúdos transmitidos os últimos 2 anos e pelo apoio monetário facultado que me permitiu realizar este trabalho.

Agradeço à Professora Doutora Lúcia Salgueiro por ter aceite o meu repentino convite de orientação e por toda a disponibilidade e amabilidade demonstrada ao longo do percurso.

Agradeço à Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias e ao Professor Doutor Francisco Rodrigues pela orientação externa, por todos os conhecimentos transmitidos que estimularam o meu interesse pelo conhecimento e me fazem querer saber mais todos os dias. Obrigada pela disponibilidade e pela paciência que sempre teve para comigo.

À Técnica Superiora Elsa Alves agradeço por me ter acolhido no laboratório de microbiologia da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias e ter disponibilizado todos os recursos necessários para o desenvolvimento do meu trabalho.

À Doutora Sara Guerreiro e ao Técnico de Análises Clínicas José Ruivo que foram indispensáveis no desenvolvimento prático deste trabalho.

À Raquel Duarte, à Daniela Anselmo, à Filipa Ferreira, à Sandra Tavares e ao Diogo Miguel por serem os melhores amigos do mundo, pela ajuda indispensável e acima de tudo no apoio moral na realização deste projeto.

Ao amor da minha vida, Paulo Santos pela infinita paciência e acima de tudo por saber sempre mostrar-me o que há de melhor em mim.

Por fim, mas não menos importantes, agradeço aos meus pais, ao meu irmão, à minha Tia Beatriz e à minha avó, os meus eternos melhores amigos, pelas oportunidades que me proporcionaram ao longo da minha vida, por me apoiarem incondicionalmente e por me fazerem sentir amada todos os dias por mais longe que estejam.

À minha avó Maria Marques Dinis, e ao meu avô Joaquim Fernandes, que nunca serão esquecidos.

Resumo

O *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) é uma das principais causas de infeção no Ser Humano, e está bem comprovado o poder de virulência desta bactéria em acometer tanto indivíduos imunodeprimidos como indivíduos imunocompetentes. Para além da associação imediata com o ambiente hospitalar, o MRSA tem sido frequentemente isolado de superfícies de serviços alimentares e associado a graves surtos de intoxicações alimentares.

Neste trabalho foi realizado um estudo microbiológico que permitiu compilar e determinar a prevalência de MRSA dentro de uma superfície alimentar da zona da Guarda, através da análise aos manipuladores, das bancadas de manipulação alimentar e ainda de diferentes produtos alimentares.

A taxa de prevalência de *S. aureus* entre os manipuladores apresentou-se razoavelmente elevada (30,8%) contudo todos os indivíduos colonizados pela bactéria eram sensíveis à ação da oxacilina.

Nas amostras realizadas às bancadas obtiveram-se como resultados não satisfatórios ($>100\text{ufc}/\text{cm}^2$), 50% das amostras para a pesquisa do *S. aureus* nas bancadas da secção do talho, as restantes 50% mostraram-se como satisfatórias, assim como todas as amostras da secção das hortofrutícolas e do pescado, com contagens médias de $8,5 \times 10\text{ufc}/\text{cm}^2$ para a secção do talho, de $0,1 \times 10\text{ufc}/\text{cm}^2$ para a secção do pescado, e contagens $<1 \times 10\text{ufc}/\text{cm}^2$ na secção das hortofrutícolas.

Em relação às amostras recolhidas dos géneros alimentícios, os resultados apresentaram-se como não satisfatórios para 50% das amostras e potencialmente perigosos para as restantes 50% da secção do talho. A secção do pescado apresentou resultados muito alarmantes, com 100% das amostras obtidas como potencialmente perigosos, e por último a secção das hortofrutícolas exibiu 100% das amostras como não satisfatórias. As contagens médias de cada sector expuseram-nos $8,8 \times 10^2\text{ufc}/\text{g}$ para o setor do talho, $4,9 \times 10^4$ para o setor do pescado, e por último, $9,9 \times 10^2\text{ufc}/\text{g}$ na secção das hortofrutícolas.

Os testes de sensibilidade à metilina indicaram-nos que existem efetivamente MRSA tanto nas superfícies como nos géneros alimentícios, o perfil resistente foi encontrado na perca do nilo, na carne de suíno moída e ainda na bancada de corte da carne, o que nos indica que a bancada de corte pode funcionar como foco de disseminação da bactéria e das suas

resistências. A baixa prevalência de *S. aureus* entre as bancadas das diferentes secções alimentares traduz-nos que existem efetivamente boas práticas de higiene e desinfeção por parte dos manipuladores.

Contudo é necessário realizar estudos longitudinais ao longo de toda a cadeia alimentar, de produção até ao consumo, para conhecer as rotas de transmissão e propagação da bactéria e das suas resistências.

Palavras-Chave: MRSA, intoxicação alimentar, superfície alimentar

Abstract

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) is a major cause of human infection and its virulence is well documented. It can affect both immunocompromised individuals as immunocompetent individuals.

Beyond the association with the hospital environment, MRSA has been frequently isolated from food services and associated with food poisoning outbreaks.

This work represents a microbiological study that allowed us compiling the prevalence of MRSA in a food establishment of Guarda, by analyzing the foodhandlers, the surfaces of food handling and different food products.

The prevalence of *S. aureus* among foodhandlers showed us reasonable results (30.8%) however all individuals colonized by the bacteria were sensitive to action of oxacillin.

The results obtained from the analyses of surfaces of food handling are unsatisfactory ($>100\text{ufc}/\text{cm}^2$) to 50% of the samples in the meat section, the remaining 50% showed to be satisfactory. The samples of horticultural and fish sections presents to be satisfactory. The average scores are $8,5 \times 10\text{ufc}/\text{cm}^2$ for the meat section, $0,1 \times 10\text{ufc}/\text{cm}^2$ for the fish section, and scores $<1 \times 10\text{ufc}/\text{cm}^2$ in the vegetables section.

The results obtained from the food products, are presented as unsatisfactory for 50% of the samples, and potentially dangerous for the remaining 50% of the meat section. The fish section showed very alarming results, with 100% of the samples obtained as potentially dangerous, and last section of horticultural exhibited 100% of the samples as unsatisfactory. Average scores of each sector exposed us the $8,8 \times 10^2\text{ufc}/\text{g}$ for the meat section, $4,9 \times 10^4\text{ufc}/\text{g}$ for the fish section, and $9,9 \times 10^2\text{ufc}/\text{g}$ in vegetables section.

Methicillin Susceptibility testing indicated us that there are MRSA in both surfaces and foodproducts, resistant profile was found in the Perca Nile, the minced pork and even in the meat cutting bench, which tells us that the cutting bench can serve like a focus for dissemination of bacteria and its resistance. The low prevalence of *S. aureus* between the benches of different food sections translates us that there are actually good hygienic practices and disinfection by the foodhandlers.

However we need to perform longitudinal studies along the food chain, from production to consumption, to know the routes of transmission and spread of bacteria and their resistances.

Keywords: MRSA, food poisoning, food establishment

Conteúdo

Resumo	III
Abstract	V
Índice de Figuras.....	IX
Índice de Tabelas.....	X
Lista de Abreviaturas	XI
1. Introdução e Objetivos.....	1
2. MRSA - Um Grave Problema de Saúde Pública	4
2.1 Emergência de resistências	4
2.1.1 Medicina Humana	4
2.1.2 Medicina Veterinária	6
3. Cenário Europeu	7
4. Cenário Nacional	9
5. Reservatórios	11
5.1. Na Comunidade	11
5.2. Na Pecuária	12
6. Fatores de virulência	13
7. Disseminação na área alimentar.....	16
7.1. Focos de disseminação	17
7.1.1. Manipuladores-Alimentos-Consumidor	17
7.2. A intoxicação por <i>S. aureus</i>	18
7.2.1 Enterotoxina estafilocócica	20
7.3. Epidemiologia.....	22
8. Importância da Segurança Alimentar	26
9. Qualidade Alimentícia e exigências do consumidor Português	30
10. Parte Experimental	34
10.1. Materiais	34
10.2. Metodologia.....	35
10.2.1. Amostras	35
10.2.1.1. Exsudado Nasal	35
10.2.1.2. Superfícies.....	36
10.2.1.3. Amostras alimentares	38

10.3. Tratamento Estatístico	40
10.4. Método de classificação.....	40
11. Resultados.....	41
11.1. Tratamento Estatístico	48
11.2. Avaliação da Qualidade Microbiológica	51
12. Discussão	53
13. Conclusão	65
14. Referências Bibliográficas	67

Índice de Figuras

Figura 1. Percentagem de isolados de MRSA por país, na União Europeia, em 2013.....	8
Figura 2. Esquema representativo do desenvolvimento de um biofilme bacteriano.	16
Figura 3. Curva de crescimento microbiano.	21
Figura 4. Realização das colheitas de produtos biológicos aos funcionários da superfície alimentar.	35
Figura 5. Sementeira das zaragoas realizadas às Bancada de diferentes secções alimentares da superfície.	37
Figura 6. Testes de Aglutinação antigénio-anticorpo de confirmação da presença da coagulase.....	37
Figura 7. Leitura do Kit I8R-System após incubação.	38
Figura 8. Crescimento de <i>S. aureus</i> nas placas semeadas com as amostras "brócolos" e "salmão", respetivamente.	39
Figura 9. Confirmação da presença do <i>S. aureus</i> na amostra dos brócolos.	40

Índice de Tabelas

Tabela 1. Percentagem de MRSA isolados numa Unidade de Saúde, em 2012.	10
Tabela 2. Prevalência de La-MRSA em suínos de produção e de reprodução na União Europeia. ³²	11
Tabela 3. Constituintes da parede celular do <i>S. aureus</i> , que lhe permite evadir-se do sistema imunitário do hospedeiro.	13
Tabela 4. Enzimas e Toxinas produzidas pelo <i>S. aureus</i> e suas funções.	14
Tabela 5. Notificação de DOA em Portugal no período de 1993 a 1998.	22
Tabela 6. Surtos de DOA por agentes causadores de doença, recolhidos pelo INSA na região de Lisboa.	23
Tabela 7. Surtos de DOA em Portugal, por agentes biológicos causadores de doença, recolhidos pelo INSA, na região do Porto.	23
Tabela 8. Número de surtos de intoxicações alimentares com o agente etiológico identificado pelo INSA, de 2009 a 2013.	24
Tabela 9. Agentes causadores de intoxicações alimentares em Portugal de 2009 a 2013.	24
Tabela 10. DOA causadas pelas toxinas do <i>S. aureus</i> em 2013 na Europa.	25
Tabela 11. Locais onde foram recolhidas as zaragatoas de superfície.	35
Tabela 12. Valor de Referência - Qualidade Sanitária.	40
Tabela 13. Frequência e percentagem dos isolados de MRSA nos manipuladores.	41
Tabela 14. Frequência dos manipuladores colonizados por <i>S. aureus</i>	41
Tabela 15. Frequência relativa dos manipuladores colonizados por <i>S. aureus</i>	42
Tabela 16. Frequência dos manipuladores colonizados por <i>S. aureus</i> consoante a idade.	42
Tabela 17. Perfil de Resistências dos isolados.	43
Tabela 18. Resistências do <i>S. aureus</i> identificado nos manipuladores.	44
Tabela 19. Contagem do <i>S. aureus</i> nas bancadas das diferentes secções alimentares.	46
Tabela 20. Contagem do <i>S. aureus</i> e caracterização segundo a qualidade sanitária das amostras alimentares.	47
Tabela 21. Leitura dos Testes de Sensibilidade à Meticilina.	48
Tabela 22. Estatística descritiva das amostras recolhidas às Bancadas.	49
Tabela 23. Estatística descritiva das amostras alimentares.	50
Tabela 24. Avaliação sanitária das Bancadas de cada sector alimentar.	52
Tabela 25. Avaliação sanitária das amostras alimentares de cada sector alimentar.	52

Lista de Abreviaturas

AIQ – Amplitude Inter-Quartil

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

aW – atividade da água

BSE – *Bovine Spongiform Encephalopathy* (Encefalopatia Espongiforme Bovina)

CDC – Centro de Controlo e Prevenção de Doenças

CA-MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina de aquisição comunitária

CV – Coeficiente de Variação

DOA – Doenças de Origem Alimentar

DOP – Denominação de Origem Protegida

EARSN – *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*

ECDC – *European Centre for Disease Prevention and Control* (Centro Europeu de Controlo e Prevenção de Doenças)

EFSA – *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar)

EUA/USA – Estados Unidos da América

FAO – *Food and Agriculture Organization*

HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Points* (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo)

HA-MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina de aquisição em ambiente hospitalar

IACS – Infecções associadas aos Cuidados de Saúde

IGP – Identificação Geográfica Protegida

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

LA-MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina associado à pecuária

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

NaCl – Cloreto de Sódio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCC – Ponto Crítico de Controlo

PLP – Proteínas de Ligação à Penicilina

PLP2a – Proteína de ligação à penicilina adquirida específica

RASFF – *Rapid Alert System for Food and Feed* (Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais)

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SE – Enterotoxina estafilocócica

SPSS – *Software Statistical Package for the Social Sciences*

UE – União Europeia

Ufc – Unidades Formadoras de Colónias

WHO – *World Health Organization*

I. Introdução e Objetivos

A crescente valorização do setor alimentar e a alta competitividade associada à preocupação da qualidade sanitária e nutricional dos alimentos, obrigou os estabelecimentos a implementar novas medidas para uma melhoria contínua da qualidade dos produtos e dos serviços prestados¹.

O conceito de qualidade alimentar para o consumidor implica essencialmente a satisfação das características, como o sabor, o aroma, a aparência, o preço e a disponibilidade do produto².

Os alimentos podem sofrer contaminações biológicas, físicas e químicas durante as diversas etapas do processamento, como o transporte, armazenamento, preparação, distribuição e consumo². A higiene do ambiente, dos manipuladores e as condições do local contribuem decisivamente para a manutenção da qualidade original do produto, estes fatores podem atuar como contaminantes que atuam como coadjuvantes no processo de contaminação e deterioração dos alimentos². A higienização adequada dos equipamentos e utensílios bem como a do próprio manipulador é um dos fatores mais importantes para o controlo da qualidade do produto².

A segurança alimentar é uma preocupação de todos os profissionais de saúde pública, uma vez que alimentos contaminados podem causar toxinfecções alimentares³. As Doenças de Origem Alimentar (DOA) são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por microrganismos e/ou pela ingestão de toxinas produzidas por estes mesmos agentes³. A ingestão de pequenas quantidades da toxina permite o desenvolvimento de intoxicação, no caso da ausência da bactéria, ou o desenvolvimento de uma toxinfecção alimentar, quando a toxina e o microrganismo atuam em simultâneo³.

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é reconhecido como sendo o microrganismo patogénico mais frequentemente isolado de superfícies de serviços alimentares⁴. Este agente é uma bactéria coco Gram positivo que tem a capacidade de provocar infeções muito graves no Ser Humano, incluindo infeções cutâneas, intoxicações alimentares, gastroenterites agudas, osteomielite, pneumonia, septicémia, síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada, entre outros⁵.

Nas últimas duas décadas este agente revelou uma extraordinária capacidade de aquisição de resistências aos antibióticos e observou-se um aumento bastante significativo na incidência do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)⁵.

Este agente oportunista é o microrganismo mais frequentemente identificado em infecções de âmbito hospitalar e mais recentemente, em infecções na comunidade, causando um aumento significativo na morbidade e mortalidade, todos os anos em todo o mundo, bem como impactos económicos consideráveis⁶.

O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina de aquisição em ambiente hospitalar (HA-MRSA) é conhecido como sendo a maior causa de Infecções associadas aos Cuidados de Saúde (IACS) e acomete maioritariamente pacientes imunodeprimidos, ou seja, afeta indivíduos com fatores de risco pré-existentes, como por exemplo hospitalizações prolongadas, a idade avançada, o uso sistemático de cateteres, procedimentos cirúrgicos, queimaduras e indivíduos transplantados. O *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina de aquisição comunitária (CA-MRSA) para além de ter a capacidade de atingir indivíduos imunodeprimidos tem a particularidade de afetar também pessoas saudáveis, que não apresentam qualquer fator de risco pré existente⁷.

O *S. aureus* está amplamente distribuído na natureza, e faz parte da flora bacteriana normal do Ser humano, da pele, do trato respiratório superior, boca e mais frequentemente do canal nasal⁴. Entre adultos saudáveis, 20% são portadores nasais desta bactéria. Estes indivíduos constituem importantes reservatórios com risco de transmitir infecções tanto a indivíduos imunodeprimidos como indivíduos imunocompetentes⁸.

As infecções hospitalares por este agente resultam em 292 mil internamentos e em 19 mil mortes anuais nos Estados Unidos da América (EUA)⁹.

Durante muitos anos as infecções causadas por MRSA eram exclusivamente adquiridas em ambiente hospitalar entretanto começaram a emergir novos reservatórios nomeadamente os animais de produção intensiva, animais domésticos e no próprio ambiente⁴.

Recentemente o MRSA tem sido também associado à pecuária^{4, 10}. As infecções humanas provocadas pelo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina associado à pecuária (LA-MRSA) têm sido relatadas em vários países, a transmissão de estirpes resistentes entre animais e de animais para Humanos deve ter uma vigilância rigorosa, uma vez que se estas es-

tirpes entrarem em ambientes comunitários e no ambiente hospitalar, podem ter um impacto extremamente negativo sobre a saúde pública^{4, 10}.

A contaminação microbiológica dos produtos alimentares também tem sido objeto de preocupação constante em diversos países². Nos últimos anos, a qualidade e segurança alimentar adquiriram grande importância, passando a fazer parte das preocupações dos consumidores, o operador do sector alimentar assume o papel de promotor local de medidas preventivas e de responsabilidade civil, aumentando a confiança e credibilidade dos seus produtos perante os consumidores².

A desinfeção e higienização dos utensílios e das bancadas onde o manipulador opera e a inocuidade dos produtos alimentícios são fatores determinantes para o controlo da qualidade do produto alimentar e para a saúde do consumidor².

Neste contexto, o objetivo primordial deste trabalho pretende observar se o MRSA se propagou no meio alimentar, nomeadamente numa superfície alimentar na zona da Guarda.

Assim, pretendeu-se:

- 1) Verificar a presença de *S. aureus* na mucosa nasal dos funcionários do estabelecimento;
- 2) Atestar a presença de *S. aureus* nas bancadas da área alimentar das carnes, do peixe e das leguminosas;
- 3) Determinar a presença de *S. aureus* nas várias áreas alimentares através da análise a diferentes géneros alimentícios;
- 4) Apurar se os *S. aureus* encontrados são portadores da resistência à meticilina.

2. MRSA - Um Grave Problema de Saúde Pública

Os antibióticos são amplamente utilizados na medicina humana, na medicina veterinária e também na agricultura e pecuária⁴. O desenvolvimento de antibióticos revolucionou o tratamento de infecções bacterianas, reduzindo drasticamente a taxa de mortalidade⁷.

2.1 Emergência de resistências

2.1.1 Medicina Humana

Globalmente, a medicina humana passou a depender fortemente de antibióticos, contudo ao longo das últimas décadas, o uso abusivo e indiscriminado da antibioterapia gerou um aumento significativo, tanto no número como no tipo de microrganismos resistentes aos antibióticos, resultando num baixo sucesso terapêutico, num aumento significativo do custo dos tratamentos, hospitalizações mais prolongadas e num aumento das taxas de mortalidade e de morbidade^{4,11}.

O primeira classe de antibióticos a ser utilizada contra as infecções provocadas pelo *S. aureus*, foi o grupo das penicilinas, que apesar de se terem mostrado bastante eficazes inicialmente, em apenas alguns meses, o *S. aureus* descobriu formas de se evadir da ação desta classe de antibióticos¹². Rapidamente adquiriu resistência através da aquisição de genes produtores de beta-lactamases, que têm a capacidade de clivar o anel beta-lactâmico da penicilina¹². Em apenas duas décadas a resistência às penicilinas tornou-se num problema global¹².

A meticilina é um derivado semi-sintético da penicilina e foi concebida para resistir à ação das enzimas beta-lactamases¹². Em pouco tempo observou-se um decréscimo acentuado das estirpes resistentes à penicilina, contudo foram apenas precisos dois anos para emergirem novas estirpes de MRSA¹².

Existem três mecanismos conhecidos para a resistência do MRSA às penicilinas: a hiperprodução de β -lactamases, a modificação das Proteínas de Ligação à Penicilina (PLP) e a produção da PLP2a, com baixa afinidade para os β -lactâmicos¹³.

Em pouco tempo o *S. aureus* adquiriu a capacidade de alterar as PLP¹². As PLP são proteínas da parede celular do *Staphylococcus aureus* que participam na produção do peptidoglicano do microrganismo, um importante constituinte da parede celular da bactéria¹². A inibição da síntese da parede celular é mediada pela ligação às PLP^{14, 15}. A resistência aos

beta-lactâmicos resistentes às beta-lactamases é mediada pelo gene *mecA*, que codifica a produção de uma PLP anômala, a PLP_{2a}¹⁴. Esta é produzida como mecanismo de defesa contra a ação do antibiótico, uma vez que possui uma baixa afinidade pelos antibióticos β-lactâmicos^{15, 11}. Como resultado a metilina e todos os seus derivados, deixaram de conseguir ligar eficazmente à parede celular bacteriana, reduzindo a capacidade do antibiótico para inibir a síntese da parede celular, e assim promover a lise celular e destruição da bactéria^{12, 14}.

A metilina foi substituída pela oxacilina uma vez que de entre todas as penicilinas, a metilina é a única que causa nefrotoxicidade¹⁶. Cerca de 15% dos pacientes que receberam tratamento com metilina durante 2 semanas de forma intermitente ou continuada (2 a 3 vezes por semana) desenvolveram nefrite intersticial aguda apresentando febre, leucocitose, eosinofilia, hematuria e proteinúria¹⁶. A oxacilina é também mais estável ao armazenamento e melhor para identificar as estirpes resistentes, embora se tenha mantido o termo MRSA por razões históricas¹⁶.

O gene *mecA* é parte integrante de um elemento genómico móvel denominado de "cassete cromossômica estafilocócica *mec*" (*SCCmec*) que está associado a aquisição de novas formas de evasão à ação dos antibióticos, nomeadamente através da produção das PLP₂^{12, 14, 15, 17}. O MRSA poder ser de quatro tipos distintos (I-IV), sendo diferentes entre os isolados na comunidade (tipo IV), e os isolados nos hospitais (HA-MRSA) (tipos I, II, III)^{10, 13, 17}. As estirpes provenientes da comunidade (CA-MRSA) possuem uma virulência acrescida pela expressão de outros alelos e genes de exotoxinas^{10, 13, 17}.

O uso irracional e excessivo da seleção dos antibióticos contribuiu para uma emergência de resistências ímpar até à atualidade. A ineficácia terapêutica dos antibióticos deve-se essencialmente a prescrições erradas, automedicações iletradas e diagnósticos indeterminados^{18, 19}.

A automedicação é definida como a utilização de medicamentos para tratar sintomas contínuos ou intermitentes de uma doença auto diagnosticada¹⁸. Esta envolve a aquisição de medicamentos com obrigatoriedade de receita médica mas sem a mesma, através da partilha de medicamentos entre membros da família ou uso de medicamentos que tenham ficado guardados em casa, que por vezes estão já fora da validade¹⁸.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a automedicação responsável pode ajudar a prevenir e tratar doenças que não necessitam de consulta médica, reduzindo a pres-

são sobre os serviços médicos, contudo a automedicação sem suporte médico pode conduzir a reações adversas graves, sobredosagens, aumentos da resistência de microrganismos e a hospitalizações prolongadas¹⁸.

A prescrição de medicamentos adequada é parte integrante através da qual um médico pode influenciar a saúde e o bem-estar do paciente¹⁹. Contudo, como é já prática comum, frequentemente são realizadas prescrições desnecessárias, exemplo disso é o caso de recorrentemente as pessoas se dirigirem à urgência com uma gripe, e o médico imediatamente prescreve um antibiótico, quando na verdade não sabe nem espera pelos testes clínicos indiquem a natureza da infecção^{19,20}.

Um grande exemplo é o uso abusivo de antibióticos para o tratamento de infeções de etiologia viral, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento²⁰.

Em Portugal a prevalência do HA-MRSA é uma das mais altas da Europa, que tem aumentado significativamente, de 31,9% em 2001, para 52,2% em 2010⁷. Por outro lado, a prevalência e epidemiologia do MRSA na comunidade Portuguesa é praticamente desconhecida⁷.

2.1.2 Medicina Veterinária

Para além do uso dos antibioticos na clínica humana, tal como já foi referido anteriormente, estes também são excessivamente usados na medicina animal⁴.

Nos animais, os antibióticos não são usados apenas no tratamento de infeções mas sim como prevenção de doenças e como promotores de crescimento da massa corporal¹³. Nos EUA o consumo dos antibióticos na medicina veterinária é 100 a 1000 vezes mais utilizado na pecuária do que na medicina Humana. Na medicina veterinária 90% dos antibióticos são efetivamente utilizados na promoção do crescimento corporal enquanto que apenas 10% é utilizado como tratamento profilático⁴.

Muitas vezes o uso destes medicamentos são utilizados sob forma continua e de aplicação terapêutica para prevenir futuras doenças em animais de agricultura intensiva²¹. A exposição constante a baixas doses de antibióticos para uso não terapêutico, dados na água ou na comida dos animais, exerce uma pressão seletiva na informação genética dos microrganismos¹¹. Cada animal sujeito a estas doses terapêuticas, é uma verdadeira fábrica de disse-

minação e de produção de resistências aos antibióticos, assim como de aquisição de novos genes de resistência¹¹.

Esta produção animal intensiva, promove grandes perdas residuais, que promovem subsequentemente, efeitos adversos na saúde Humana e graves repercussões para o ambiente²². Um exemplo de contaminação ambiental é o aproveitamento da terra fertilizada pelos dejetos dos suínos¹¹. O estrume animal promove a transferência horizontal de genes da resistência para o solo, e as águas residuais resultantes do confinamento suíno, resultam na disseminação dos genes de resistência para os campos adjacentes, através da irrigação¹¹. Estes animais transferem os microrganismos resistentes para o Homem e indiretamente para o ambiente através da contaminação do solo, do ar e da água, contribuindo para uma diminuição significativa da qualidade de vida da população que vive perto destas indústrias¹¹.

Para além das infeções humanas, é importante referir que o MRSA também tem grandes impactos económicos na indústria do leite²³. O MRSA foi identificado pela primeira vez no leite de vacas leiteiras na Bélgica que sofriam de mastite bovina⁹. A mastite bovina é uma doença inflamatória que afeta as glândulas mamárias dos bovinos, as glândulas tornam-se fibrosas e inférteis, podendo até levar à morte do bovino²³. O tratamento e a prevenção da mastite levam a uma grande utilização de antibióticos da classe dos beta-lactâmicos²³. A mastite induzida pelo MRSA tem emergido como sendo uma grande causa de perdas diárias na produtividade e gera a necessidade de providenciar componentes alternativos capazes de controlar estas estirpes bacterianas resistentes²³.

Têm sido descritas estirpes novas de LA-MRSA em suínos, bovinos e aves de produção intensiva, mas também em animais de companhia, cães e gatos, cavalos, aves domésticas e em pessoas que têm contacto com estes animais^{4, 21, 22}.

A presença do MRSA tem sido também identificada em produtos alimentares de origem animal, contudo ainda não existem muitos dados sobre o que implica o consumo destes produtos⁴.

3. Cenário Europeu

O *S. aureus*, como anteriormente foi referido, tem revelado uma extraordinária capacidade de aquisição de resistências aos antibióticos. Atualmente o MRSA é resistente a múltiplas classes de antibióticos, nomeadamente a todos os antibióticos de largo espectro, os

beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes), à meticilina, aos glicopéptidos (vancomicina) e recentemente à rifampicina, às fluoroquinolonas e à linezolida, o que limita drasticamente as opções terapêuticas disponíveis²⁴.

O *European Center for Disease Prevention and Control (ECDC)* publica anualmente o relatório do *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSN)*, que compreende um sistema de vigilância de resistências aos antibióticos de toda a Europa, incluindo a prevalência do MRSA²⁴. O relatório de 2012 estimou uma prevalência nacional de MRSA superior a 50% (53,8%), um dos piores cenários de toda a Europa, em conjunto com a Roménia e a Itália²⁴.

O relatório de 2013 apresenta melhorias pouco significativas, com uma prevalência nacional de 46,8%²⁵.



Figura I. Percentagem de isolados de MRSA por país, na União Europeia, em 2013.

(Fonte ECDC: Setembro de 2013)

A média da União europeia da prevalência do MRSA desde 2010 tem vindo a diminuir, como podemos observar na tabela I.

Em 2010 a média europeia incidia entre os 22,2%, contudo em 2013 observamos um decréscimo para 18%, apesar de se notarem melhorias significativas, existem ainda 7 países com médias muito superiores à média europeia, como é o caso de Portugal (44,8%)²⁶. Apesar da prevalência global de MRSA na Europa ser de 22,2%, verificam-se diferenças significativas entre os diversos países, sendo a prevalência consistentemente mais baixa na Finlândia, Dinamarca, Islândia, Noruega, Estónia e a Holanda (>5%), e mais elevada no Sul da Europa e Europa de Leste²⁶. O mais preocupante é que apesar de se observarem melhorias significativas desde 2010, comparativamente à tendência global europeia, a prevalência de MRSA em Portugal mantém-se indiscutivelmente alta²⁶.

A fim de continuar a reduzir a propagação de MRSA na Europa, têm sido implementadas estratégias globais essencialmente nos sectores da saúde, em instituições de cuidados intensivos, e atendimento ambulatorio²⁶.

Em relação ao LA-MRSA este já está bem documentado na Europa, em 2009 a EFSA identificou MRSA em explorações de suínos em 17 Estados Membros da União Europeia²⁷. Na Holanda foi descoberto que 45% dos produtos de origem suína e 63% dos produtos de origem bovina, apresentavam estirpes de *S. aureus*, e 3% e 4% dos isolados apresentavam resistência à oxacilina²⁸.

4. Cenário Nacional

Segundo um trabalho efetuado na Universidade Nova de Lisboa, em Portugal existe uma elevada frequência de MRSA na comunidade (21,6%)²⁹. No entanto, verificou-se que apenas uma pequena proporção diz respeito a estirpes clonais características da comunidade (11,4%)²⁹. A vasta maioria dos isolados de MRSA existentes na comunidade em Portugal, pertencem a estirpes clonais características do ambiente hospitalar (88,6%)²⁹.

Identificaram ainda uma elevada diversidade genética nos isolados pertencentes a tipos clonais associados à comunidade (CA-MRSA), incluindo clones considerados epidémicos (USA300, USA400, USA700), Sudoeste do Pacífico (SWP), Europeu e (ST398) e clones menos epidémicos (ST1810)²⁹. Em contraste, apenas dois clones epidémicos foram encontrados entre os MRSA pertencentes a tipos clonais associados ao hospital (HA-MRSA), em especial o tipo clonal EMRSA-15 (77,2%), mas também o tipo clonal Nova Iorque/Japão (NY/JP) (14,9%). Coincidentemente estes são os dois clones com maior prevalência nos hospitais portugueses²⁹.

Em resumo, estes resultados indicam que a elevada prevalência de MRSA na comunidade em Portugal parece resultar, principalmente, da disseminação de isolados pertencentes a tipos clonais tipicamente hospitalares²⁹.

Segundo dados publicados pela Direção Geral de Saúde, em 2012 foram identificados 1349 microrganismos em 1122 doentes em Unidades de Cuidados Intensivos. Na tabela I podem-se observar os microrganismos isolados por grupos e respetivas resistências aos antimicrobianos. Como podemos observar o *S. aureus* é o microrganismo mais isolado em âmbito hospitalar. Dos isolados identificados como *S. aureus*, mais de 70% apresentam resistência à oxacilina³⁰.

TABELA I. PERCENTAGEM DE MRSA ISOLADOS NUMA UNIDADE DE SAÚDE, EM 2012.

Microrganismos isolados	N.º	% de resistência		% sobre total isolados
Cocos Gram positivo	454			34,0%
<i>Staphylococcus aureus</i>	243	MRSA – 73,7%		18%
<i>Staph coag. negativo</i>	61			4,5%
<i>Enterococcus</i>	131	VRE – 22,1 %		9,7%
<i>E. faecium</i>		30,0 %		
<i>E. faecalis</i>		15,5%		
<i>Streptococcus spp.</i>	17			1,3%
Outros Gram positivo	7			0,5%
Enterobacteriaceae	467	C3G-R	CAR-R	35%
<i>E. coli</i>	198	29,8%	2,0%	14,7%
<i>Klebsiella spp</i>	134	46,3%	6,7%	9,9%
<i>Enterobacter spp</i>	50	46,0%	8,0%	3,7%
<i>Proteus spp.</i>	47	15,2%	8,5%	3,5%
<i>Citrobacter spp</i>	12	16,7%	1,2%	1,2%
<i>Serratia spp</i>	12	8,3%	1,2%	1,2%
Outras enterobacteriáceas	18			1,3%
Gram negativo não fermentativo	171			12,7%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	79	CAR-R :	27,5%	5,9%
<i>Acinetobacter sp.</i>	71	CAR-R :	84,5%	5,3%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6	-		0,4%
Outros Gram negativos	15	-		1,1%
Anaeróbios	49			3,7%
<i>Clostridium difficile</i>	45	-		3,4%
Outros	4	-		0,3%

(Fonte INSA: Novembro de 2012)

Em relação ao LA-MRSA existem também já referências de infeções por MRSA em quintas de produção intensiva de suínos. Em 2009, três quintas suinícolas sofreram de um surto de LA-MRSA o que resultou na mortalidade de mais de 20% dos suínos. Foi descoberto que muitos dos suínos saudáveis eram intermitentemente colonizados durante a sua vida pela mesma estirpe que causou a morte de outros³¹.

Em 2010 a EFSA publicou o primeiro inquérito à escala da UE sobre a prevalência de MRSA em explorações de suínos reprodutores, a pesquisa mostra que o MRSA ST398 é a estirpe predominante de MRSA nas explorações com suínos reprodutores na União Europeia³².

Segundo a tabela 2, Portugal apresenta uma média superior à da média da união Europeia de prevalência de MRSA em suínos de reprodução (14,7%), apresentando valores superiores à Itália (14%), Luxemburgo (0%) e Holanda (12,8%)³². Os valores para a prevalência na produção intensiva não são tao alarmantes para Portugal, representando apenas 11,8%³². Isto indica que os suínos que geram novos suínos neste momento são mais colonizados pelo LA-MRSA do que os suínos utilizados para gerar produtos alimentares³².

TABELA 2. PREVALÊNCIA DE LA-MRSA EM SUÍNOS DE PRODUÇÃO E DE REPRODUÇÃO NA UNIÃO EUROPEIA.³²

Prevalência do MRSA	
	(Suínos de reprodução/Suínos de produção)
MRSA ST398 %	
União Europeia	13.1 / 25.5
Bélgica	40 / 35.9
Alemanha	43.5 / 37.4
Itália	14 / 21.6
Luxemburgo	0 / 36.6
Holanda	12.8 / 17.9
Portugal	14.7 / 11.8
Espanha	46 / 50.2

5. Reservatórios

5.1. Na Comunidade

A transmissão do MRSA ocorre principalmente pelo contacto dérmico direto entre pessoas. No entanto, esta bactéria sobrevive por longos períodos em objetos inanimados nomeadamente em roupas, superfícies de plástico e superfícies metálicas, que podem constituir um importante reservatório para a sua disseminação²⁴.

As ambulâncias, os transportes públicos e universidades, foram apresentadas como possíveis reservatórios de MRSA²⁴. Mais recentemente surgiu em Portugal a primeira descrição de contaminação de transportes públicos por MRSA, revelando uma prevalência alarmante (26%) numa rede de autocarros da cidade do Porto²⁴. Este estudo fornece evidências de que a principal estirpe hospitalar de MRSA, disseminado na generalidade dos hospitais Portugueses, está a sair do meio hospitalar para o meio ambiente, a comunidade²⁴.

Também em domicílios foram identificados vários objetos contaminados, nomeadamente brinquedos, comandos de televisão e de consolas, telefones, maçanetas de portas, travesseiros e roupas de cama, torneiras e toalhas de mão²⁴.

A preocupação pública com o MRSA aumentou em 2005, quando o CDC publicou que houve mais mortes por infeções causadas pelo MRSA do que pelo Vírus da Imunodeficiência Humana nos EUA³³. Enquanto as infeções a partir das estirpes de HA-MRSA raramente

ocorrem fora dos cuidados de saúde, as infeções causadas por CA-MRSA tornaram-se muito comuns nos hospitais dos EUA³³.

Desde 2001, vários estados promulgaram leis destinadas a retardar a disseminação do MRSA, focados em melhorar os serviços de saúde, através da inibição da utilização de determinados antibióticos, descolonização dos portadores assintomáticos e dos profissionais de saúde e do isolamento dos infectados^{24,33}.

Outra medida utilizada nos EUA, tem sido através da realização de publicidade para aumentar a consciência da comunidade das infeções por MRSA e para incentivar o uso de medidas preventivas como a cobertura de lesões de pele e a higienização sistemática das mãos para reduzir a sua transmissão³³.

5.2. Na Pecuária

Anteriormente as infeções por MRSA em animais eram identificadas exclusivamente por MRSA associado à pecuária, e nunca antes tinham sido relacionadas com infeções humanas, tanto na comunidade como a nível hospitalar⁹. No entanto foi já confirmado que o contacto direto com explorações de animais apresenta-se como um fator de risco para a colonização e infeção no Ser Humano, sendo o risco dependente da frequência e da intensidade dos contactos^{9,24}.

O LA-MRSA, desde 2003 tem surgido em animais e Seres Humanos, em áreas geográficas com exploração intensiva de animais, nomeadamente na Europa, América do Norte e na Ásia³⁴.

Um estudo publicado pela EFSA em 2009 avaliou a prevalência do MRSA em explorações suínolas de 17 países da União Europeia, incluindo Portugal. Observou-se uma prevalência superior a 35% na Itália, Bélgica, Alemanha e Espanha e de 12% no nosso país²⁴.

Verificou-se que em zonas de elevada densidade de MRSA de origem suína, esta estirpe pode influenciar a epidemiologia do MRSA nos serviços de saúde²⁴. Num hospital holandês situado numa zona de grande densidade suína, a incidência do MRSA triplicou em poucos anos e o mesmo se verificou num hospital alemão próximo duma região com intensa criação de gado, onde 22% dos doentes colonizados por MRSA, no momento da admissão, eram portadores da mesma estirpe que colonizavam os suínos²⁴.

Para além dos animais de produção intensiva, que são apresentados como sendo potenciais reservatórios de MRSA, os animais domésticos como os cães, gatos e aves, também

podem transportar a bactéria e suas resistências, por isso há um risco elevado que as mesmas estirpes possam afetar indivíduos saudáveis e entrarem assim na comunidade²⁴.

6. Fatores de virulência

A versatilidade deste agente patogénico resulta do facto de possuir um vasto leque em fatores de virulência o que lhe permite uma invasão direta dos tecidos, evasão do sistema imunitário do hospedeiro e ainda garante a sua proliferação e sobrevivência no organismo hospedeiro^{35, 36}.

Os mecanismos de patogenicidade podem ser classificados em 3 categorias. A primeira compreende todos os fatores relacionados com a aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, como a produção de moléculas de fibrinogénio, fibronectina, colagénio ou da enzima coagulase (tabela 3)³⁵⁻⁴¹.

TABELA 3. CONSTITUINTES DA PAREDE CELULAR DO *S. AUREUS*, QUE LHE PERMITE EVADIR-SE DO SISTEMA IMUNITÁRIO DO HOSPEDEIRO.

Constituinte	Modo de atuação
Ácido Teicóico	Ativa a via alternativa do complemento e estimula a produção de citocinas.
Glicanopeptídeo	Polímero que atua como recetor para leucócitos polimorfonucleares e induz a produção da IL-1, que vai atuar como elo entre as respostas inflamatórias e imunes, e opsoninas, que revestem a bactéria, tornando-a facilmente fagocitada.
Proteína A	Proteína ligada ao peptidoglicano que se liga a porção Fc da molécula de IgG, contribuindo para a geração de efeitos quimiotáticos, anti-fagocitários, com libertação de histamina, reações de hipersensibilidade e lesão plaquetar.
Cápsula	Estrutura que envolve a parede celular protegendo a bactéria da fagocitose mediada pelo complemento (C3b) por parte dos neutrófilos, aumentando a capacidade de invasão dos tecidos até chegar à corrente sanguínea.
Adesinas	Moléculas que promovem a aderência da bactéria às células do hospedeiro e a diversos tipos de materiais.

A segunda categoria corresponde aos fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, através da produção de inúmeras enterotoxinas estafilocócicas (SEs A-E, G-J, K, L, M, O e P), toxinas esfoliativas, a toxina do Síndrome do Choque Tóxico (TSST-I), a proteína A, lipases e polissacarídeos capsulares (tabela 4)³⁵⁻⁴².

A terceira categoria determina os fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro, como a penetração nos tecidos e adesão de todo o tipo de superfícies, os quais incluem as toxinas α , β , γ -hemolisinas, leucocidinas e adesinas (tabela 4)³⁵⁻⁴². O elevado po-

tencial infeccioso deste microrganismo não se restringe apenas à sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também na produção de moléculas com grande poder patogénico, que inclui as beta-lactamases, coagulases, hialuronidasas e catálases (tabela 4). Além dessas enzimas, o *S. aureus* também produz DNAses, lipases, proteases e esterases³⁵⁻⁴².

TABELA 4. ENZIMAS E TOXINAS PRODUZIDAS PELO *S. AUREUS* E SUAS FUNÇÕES.

	Classe	Função
Beta-lactamases	Enzima	Inativa os antibióticos beta-lactâmicos (ex. penicilinas e cefalosporinas) pela clivagem do anel beta-lactâmico.
Coagulase	Enzima	Converte o fibrinogénio em fibrina, provocando a formação de trombos de fibrina.
Hialuronidase	Enzima	Despolimeriza o ácido hialurónico, auxiliando a invasão do microrganismo pelos tecidos.
Catalase	Enzima	Converte o peróxido de hidrogénio em oxigénio e água evitando a destruição da bactéria.
Alfa-hemolisina	Toxina	Tem a capacidade de promover a lise dos eritrócitos e em casos de intoxicações muito graves, causar danos nas plaquetas.
Beta-hemolisina	Toxina	Degrada a esfingomiolina, provocando lesões na membrana dos eritrócitos e, conseqüentemente, conduzindo ao rebentamento dos mesmos.
Delta-hemolisina	Toxina	Possui propriedades tensoativas e altera o equilíbrio hidroléctrico, inibindo a absorção de água pelo íleo, desencadeando diarreias agudas.
Gama-hemolisina	Toxina	Apresenta atividade hemolítica, cujo mecanismo ainda não foi devidamente estabelecido.
PVL	Toxina	Esta proteína altera a permeabilidade da membrana e ataca os leucócitos e os macrófagos. Essa alteração permite a entrada de catiões, como o Ca^{+2} , resultando na desgranulação celular e induzindo a citólise dos leucócitos.
Esfoliativa	Toxina	Promove a clivagem do extrato granuloso da epiderme, causando síndromes cutâneas severas (Ex. Síndrome da Pele Escaldada e o Impetigo).
TSST-I	Toxina	Provoca erupção cutânea descamativa, febres muito altas, choque e falência de múltiplos sistemas orgânicos, podendo conduzir à morte (Síndrome do Choque Tóxico).
Enterotoxinas	Toxina	Toxinas pirogénicas, termoestáveis, responsáveis por intoxicações alimentares, podendo provocar vômitos e diarreias.

O *S. aureus* consegue crescer em ambientes com temperaturas entre 7 e 46°C e tem uma temperatura óptima de crescimento entre 35 e 37°C, é extremamente resistente a ciclos de congelação/descongelação e sobrevive durante períodos alargados em alimentos armazenados a temperaturas inferiores a -20°C^{36, 43}. A bactéria é destruída pela pasteurização, mas as enterotoxinas já formadas são resistentes aos processos térmicos, incluindo os regimes utilizados para esterilizar enlatados de baixa acidez^{36, 43}.

Consegue crescer em ambientes com valores de pH entre 4,5 e 9,3 e apresenta uma taxa específica de crescimento máxima em ambientes com valores de pH entre 6,0 e 7,0^{36, 43}.

É reconhecida pela sua elevada osmotolerância o que lhe permite crescer em ambientes com uma $a_w > 0,86$ e com uma concentração de NaCl entre 5 e 7% desenvolvendo-se com bastante facilidade em alimentos submetidos à salmoura, algumas estirpes crescem a concentrações de NaCl de 20%. É uma bactéria anaeróbia facultativa mas a toxina não é produzida em condições de anaerobiose^{36, 43}.

Como anteriormente foi mencionado, esta bactéria tem ainda a capacidade de sobreviver por longos períodos em materiais metálicos e plásticos através da formação de biofilmes⁴⁴.

Os biofilmes são comunidades bacterianas de arquitetura extremamente complexa, nos quais as bactérias são mantidas juntas por uma matriz extracelular contendo tipicamente extrapolissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos^{43, 44}. Após a fixação inicial da parede bacteriana a uma superfície através da adesão intercelular, estas começam a multiplicar-se, secretando simultaneamente uma matriz consistente de substâncias poliméricas extracelulares, posteriormente as bactérias agregam-se formando uma comunidade isolada⁴⁵.

As bactérias que têm a capacidade de formar biofilmes são a principal fonte de contaminação alimentar que dão origem a graves surtos epidemiológicos de doença de origem alimentar^{44, 46}. Os biofilmes são um problema sério na indústria alimentar, uma vez que é extremamente difícil eliminar um biofilme mesmo com a sanitização e desinfecção adequada do local^{44, 45}. Diversos estudos têm mostrado que mesmo após desinfecção algumas instalações permanecem fortemente contaminados^{44, 45}.

Os biofilmes são atualmente um grave problema de saúde pública uma vez que têm um grande impacto nas indústrias alimentares e ainda no consumidor, sendo responsáveis pela causa de doenças crônicas difíceis de tratar, da deterioração de diversos géneros alimentícios e ainda a sua capacidade de resistência à desinfecção pelos produtos de limpeza convencionais⁴⁵.

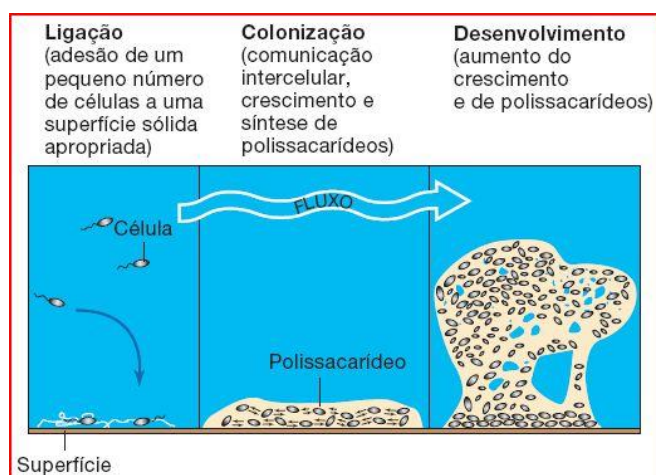


FIGURA 2. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO DESENVOLVIMENTO DE UM BIOFILME BACTERIANO.

(fonte: www.lookfordiagnosis.com)

7. Disseminação na área alimentar

O MRSA associado à pecuária, como anteriormente foi mencionado, tem vindo a ganhar uma atenção especial nos últimos anos^{47, 48}. A identificação do LA-MRSA em animais para produção de géneros alimentícios tem levantado algumas dúvidas sobre a presença de MRSA em alimentos de origem não animal^{47, 48}.

As novas metodologias utilizadas na produção alimentar, tais como o processamento mínimo, a produção em massa e a globalização, entre outros, introduziu novos fatores e determinou condições que permitem o desenvolvimento de bactérias patogénicas⁴⁹.

Vários estudos têm sido realizados em diferentes partes do mundo aos géneros alimentícios destinados ao consumo humano, para detetar a presença de MRSA e as suas estirpes^{47, 48}. Os resultados demonstraram que as estirpes de MRSA identificadas nos alimentos de origem animal correspondem a estirpes comumente encontradas nos seres humanos^{47, 48}. Esta observação sugere que há uma provável contaminação cruzada dos alimentos, no matadouro ou durante o processamento do género alimentício com o manipulador^{47, 48}.

Hoje sabe-se que os alimentos contribuem como um reservatório para a disseminação de resistência aos antibióticos⁴⁹.

A ampla aplicação dos antibióticos na medicina humana e na veterinária, o uso de antibióticos na agricultura, e o uso comum de antissépticos e desinfetantes resultaram em pressões seletivas⁴⁹. Uma das aquisições de resistência é mediada por transferência horizontal de elementos genómicos móveis portadores de genes de resistência⁴⁹. As bactérias que contêm elementos de resistência a antibióticos, como plasmídeos, integroes e ilhéus de patogenicidade, são um risco para a saúde pública, porque podem atuar como um reservatório para a disseminação de resistências⁴⁹⁻⁵¹. Devido ao facto do *S. aureus* ser muito prevalente no ambiente alimentar e nos géneros alimentícios, o MRSA pode seguir o mesmo padrão de disseminação e apesar de existirem escassas referências a infeções de MRSA neste ambiente, sabe-se que este entra efetivamente na cadeia alimentar^{49, 51}.

Estudos recentes confirmaram a presença do MRSA na carne, incluindo vaca, porco, frango, peixe e outros animais⁴⁹⁻⁵¹. Para além da carne este foi já identificado no leite pasteurizado e não pasteurizado e sobretudo em refeições prontas a comer, como saladas, sandes, molhos e sobremesas^{52, 53}.

A ocorrência de MRSA não só em animais produtores de alimentos mas também em alimentos de origem animal pode representar uma questão relevante que diz respeito à segurança alimentar e defesa do consumidor^{50, 51}.

7.1. Focos de disseminação

7.1.1. Manipuladores-Alimentos-Consumidor

De acordo com a EFSA, a distribuição do MRSA no ambiente deve ter uma atenção especial no que diz respeito ao manusear alimentos contaminados uma vez que pode ser um foco potencial de transmissão desta bactéria e das suas resistências⁵³.

A propagação de DOA via manipuladores de alimentos é um problema comum e persistente em todo o mundo^{54, 55}. Muitas doenças são transmitidas e causadas por microrganismos que entram no corpo através dos alimentos⁵⁵. Numerosos surtos de gastroenterite têm sido associados com a ingestão de alimentos crus, alimentos que incorporam ingredientes crus ou alimentos obtidos a partir de fontes inseguras⁵⁵.

As principais contaminações microbianas ocorrem devido a falhas no processamento ao longo da cadeia de produção, ou seja, matéria-prima contaminada, higienização inadequada dos equipamentos e utensílios utilizados no preparação dos alimentos, armazenamento e

embalamento incorreto e manipuladores com hábitos de higiene pessoal deficiente, podendo até alguns serem portadores de microrganismos assintomáticos⁵⁶.

A higiene do ambiente e as condições do local podem contribuir decisivamente para manutenção da qualidade original dos alimentos, podendo atuar como fonte de contaminantes e/ou condições ambientais que agem como coadjuvantes no processo de contaminação e deterioração dos alimentos⁵⁷.

O MRSA tem uma prevalência proporcional à manipulação do alimento, ou seja quanto mais processos de manuseamento sofrer o alimento ou produto alimentício, seja por ação humana ou mecânica, maior será a probabilidade do alimento ficar contaminado⁵³.

A higienização adequada dos equipamentos e utensílios bem como a do próprio manipulador é um dos fatores mais importantes para o controlo da qualidade do produto alimentício⁵⁷.

O facto do *S. aureus* existir na flora normal do nariz e na pele do manipulador de alimentos, pode ser facilmente transmitido para todo o tipo de produtos alimentares^{55, 57}. As mãos dos funcionários de serviços alimentares de “prontos-a-comer” são um dos principais veículos de disseminação de doenças transmitidas por alimentos contaminados, causadas principalmente pela falta da higiene pessoal⁵⁴. A higienização das mãos, pulsos e dos braços, o uso de aventais, máscaras, luvas e toucas, a lavagem e o acondicionamento dos utensílios em ambientes limpos, são medidas preventivas fundamentais que previnem o desenvolvimento das bactérias⁵⁸.

7.2. A intoxicação por *S. aureus*

Na União Europeia (EU), o número de surtos de intoxicações alimentares está a aumentar, com 386 surtos reportados em 2013⁵⁹. A intoxicação alimentar causada por *S. aureus* é uma intoxicação que resulta do consumo de alimentos que contêm quantidades suficientes (entre 20ng a 1ug) de uma ou várias enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas^{60, 61}. Os sintomas da intoxicação ocorrem nas primeiras 2h a 6h após o consumo dos alimentos contaminados, e incluem náuseas, vômitos violentos, cólicas abdominais, com ou sem diarreia⁶¹. A diarreia pode ocorrer devido à inibição da reabsorção de água e eletrólitos no intestino delgado^{42, 43, 60-62}.

A doença geralmente é autolimitada e resolve-se nas 24h/48h seguintes aos sintomas. Ocasionalmente pode ser severa o suficiente que prossiga um internamento para reposição do equilíbrio hidroeletrolítico, particularmente nas crianças e idosos que têm o sistema imunológico mais debilitado^{42, 43, 61- 63}.

Pequenas doses da toxina podem provocar intoxicações, exemplo disso foi a ingestão de apenas 0,5ng/ml de enterotoxinas estafilocócias num leite achocolatado contaminado que promoveu um grande surto de intoxicações no Irão⁶³.

Os alimentos que usualmente estão implicados em surtos de intoxicação envolvem produtos de origem animal, ovos, leite e seus derivados, saladas, produtos de pastelaria e alimentos salgados, como o presunto, carne fumada e o bacalhau^{61, 64}. Como anteriormente foi referido, o *S. aureus* tem a capacidade de tolerar concentrações de NaCl até 20% e ainda cresce numa aW relativamente baixa (aW=0,86)^{61, 64}.

Nos casos mais graves, os antibióticos não podem ser utilizados como tratamento uma vez que na maior parte dos surtos a bactéria permanece ausente no hospedeiro, sendo só a toxina a provocar a patologia³³. A toxina não tem os recetores adequados para existir uma antibioterapia eficaz³³. Nestes casos o tratamento é apenas de suporte, tratando os sintomas⁶².

O grande problema da identificação da etiologia da intoxicação reside na dificuldade em determinar a sua presença porque se a intoxicação for provocada unicamente por toxinas, a toxina não cresce em meios de cultura como as bactérias, a única forma de ser detetada é através de biologia molecular^{62, 64}.

O *S. aureus* é termolábil e facilmente eliminado por processos moderados de temperatura, contudo as enterotoxinas são extremamente resistentes a temperaturas elevadas e como são produzidas antes do alimento contaminado ser cozinhado, torna-se muito difícil a sua eliminação⁶².

A contaminação microbiológica dos produtos alimentares tem sido objeto de preocupação constante em diversos países⁵⁹. Nos EUA estima-se que anualmente entre 1 milhão a 2 milhões de pessoas são acometidas por gastroenterites provocadas por toxinas, sobretudo por produtos de origem animal⁵⁹. No Brasil, segundo os dados do Ministério da Saúde, foram registados 593,212 casos de intoxicação alimentar entre 1984 a 1997, porém sem especificar as toxinas, os microrganismos ou as fontes envolvidas⁵⁹.

Estes dados provavelmente são insuficientemente estimados devido a diagnósticos mal efetuados, colheitas mal efetuadas da amostra, exames laboratoriais errados e ainda à falta de notificação dos surtos⁵⁹. O controlo desta patologia tem um impacto social e económico efetivamente sério, representando uma perda considerável na produtividade do trabalho, despesas hospitalares, perdas económicas avultadas nas indústrias alimentares, nos serviços de *catering* e em restaurantes^{59, 61}. Por esse motivo é muito importante a aplicação adequada das medidas de controlo sanitário dos alimentos e superfícies, particularmente das matérias-primas de origem animal^{59, 61}.

Um exemplo preocupante tem sido o consumo exagerado da conhecida “*fast food*”. Por exemplo os *nuggets* representam um produto muito popular em todo o mundo e encontram-se em praticamente todas as cadeias de *fast food*⁶³. Um grande problema associado os *nuggets* é o facto de estes sofrerem um tratamento térmico extremamente curto, de aproximadamente 8 minutos, e por isso, é esperado que se encontrem frequentemente bactérias e toxinas se não existir o mínimo de higiene durante todo o processamento do produto⁶³.

7.2.1 Enterotoxina estafilocócica

As enterotoxinas estafilocócicas são exotoxinas sintetizadas pelo *S. aureus* na transição do final da fase exponencial e do início da fase estacionária de multiplicação bacteriana, quando as condições de tempo e temperatura são favoráveis (ilustração 3)⁶¹.

Para além de serem extremamente resistentes ao calor, as toxinas são também extremamente resistentes ao frio, ao pH e à digestão proteolítica^{61, 64-66}.

Estas pertencem a uma família de toxinas pirogénicas que lhes dá a habilidade de atuarem como superantígenos, ou seja possuem a capacidade de ativarem uma grande quantidade de linfócitos T^{34, 61}. A ampla expansão dos Linfócitos T e dos linfócitos B resulta numa massiva libertação de citocinas pelo hospedeiro⁶¹. Estas citocinas atuam como vasodilatadores capilares conduzindo à hipotensão, ao choque anafilático, imunossupressão e, em casos mais graves, na falência de múltiplos órgãos⁶¹.

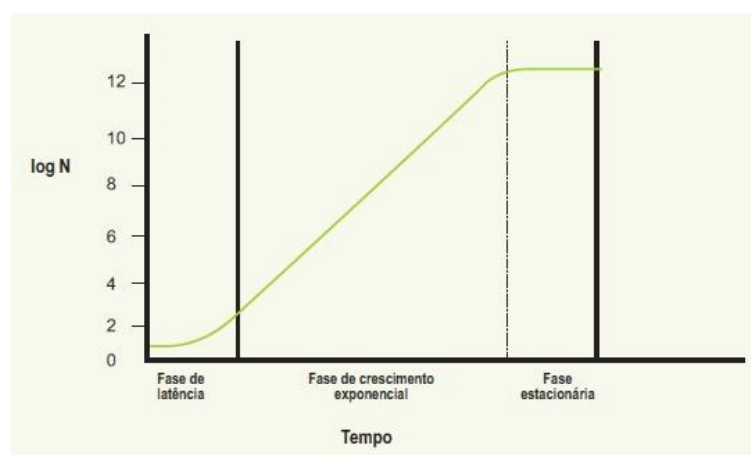


FIGURA 3. CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO.

(Fonte: vongolaetec.forumeiros.eu)

Atualmente conhecem-se 22 tipos de enterotoxinas estafilocócicas, as clássicas SEA, SEB, SEC, SED e SEE que são responsáveis pelas intoxicações provocadas ao Ser Humano, os novos tipos de SE (SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET) e ainda as SEL^{61, 63}. Todas as SE clássicas têm atividade emética, a toxina SEA é a que está mais frequentemente envolvida em surtos de origem alimentar e a que está diretamente envolvida com a modificação da função dos neutrófilos⁶¹. Estima-se que a atividade biológica da SEB é perdida após ser submetida a temperaturas de 60°C durante 16h e em pH 7,3^{61, 63}.

7.2.1.1. Modo de ação

Uma vez ingeridas, as SE resistem ao pH estomacal e às enzimas proteolíticas que dissolvem o bolo alimentar, ao chegarem ao intestino, estimulam as terminações nervosas, transmitindo impulsos sobre o nervo vago que subsequentemente estimula o centro emético e aumenta a motilidade intestinal^{34, 61, 67}. As enterotoxinas penetram o intestino e ativam respostas imunes locais, sendo responsáveis por lesões epiteliais na mucosa do trato gastrointestinal, especialmente no estômago e na porção inicial do intestino^{34, 61, 67}. A liberação de mediadores inflamatórios, como a histamina, substância P e leucotrienos provocam emese^{34, 61}.

7.3. Epidemiologia

A variedade e extensão das DOA é tal, que nenhum país é capaz de fornecer dados exatos sobre a sua incidência ou prevalência. Ainda que exista um sistema de informação adequado, só uma pequena proporção das doenças é que chega ao conhecimento das autoridades de saúde pública (tabela 5)⁶⁶.

Os casos notificados nos países industrializados alcançam muito provavelmente menos de 10% da incidência real⁶⁶. Estima-se que a incidência anual de doenças alimentares na UE se situe entre os 6 e 80 milhões de casos⁶⁶.

Ao contrário de outros países europeus, Portugal não possui um sistema nacional de vigilância e controlo de doenças de origem alimentar, pelo que o número de ocorrências registado é muito limitado, evidenciando as lacunas do sistema de notificações no país⁶⁶.

TABELA 5. NOTIFICAÇÃO DE DOA EM PORTUGAL NO PERÍODO DE 1993 A 1998.

Ano	Nº de Surtos	Nº de Casos	Casos Isolados	Pessoas Hospitalizadas
1987	25	215	2	72
1988	39	994	4	73
1989	34	1044	1	145
1990	30	187	1	25
1991	35	694	6	93
1992	29	798	3	129
1993	43	1068	7	270
1994	49	1051	10	207
1995	45	885	16	167
1996	60	786	9	95
1997	60	1615	12	134
1998	47	1411	24	602

(Fonte: INSA, 1998.)

Segundo o registo de ocorrências em Portugal no 7º Relatório da OMS do Programa de vigilância e controlo de DOA na Europa, verificou-se que o *S. aureus* é responsável, em conjunto com a *Salmonella enteritidis* e com o *Clostridium botulinum*, por mais de 80% das ocorrências registadas pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) de Lisboa e do Porto entre 1993 e 1998 (tabelas 6 e 7)⁶⁶.

TABELA 6. SURTOS DE DOA POR AGENTES CAUSADORES DE DOENÇA, RECOLHIDOS PELO INSA NA REGIÃO DE LISBOA.

Agente Causador	Ano		Total	
	1997	1998	Nº	%
<i>Salmonella enteritidis</i>	8	1	9	15,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	7	11	18,3
<i>B. cereus</i>	1	-	1	1,7
<i>Y. enterocolitica</i>	1	-	1	1,7
Microrganismos aeróbicos	1	-	1	1,7
<i>E. coli</i> enterotoxigenico e enterohemorrágico	-	1	1	1,7
<i>S. enteritidis</i> + <i>S. aureus</i>	-	1	1	1,7
<i>S. enteritidis</i> + <i>S. aureus</i> + <i>B. cereus</i>	-	1	1	1,7
<i>S. aureus</i> + <i>B. cereus</i>	-	1	1	1,7
Desconhecido	24	9	33	55,0
Total	39	21	60	100,0

(Fonte: INSA, 1998.)

TABELA 7. SURTOS DE DOA EM PORTUGAL, POR AGENTES BIOLÓGICOS CAUSADORES DE DOENÇA, RECOLHIDOS PELO INSA, NA REGIÃO DO PORTO.

Agente Causador	Ano						Total	
	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1993 - 1998	
							Nº	%
<i>Clostridium botulinum</i> tipo B	4	4	7	7	-	15	37	18,3
<i>Clostridium botulinum</i> tipo E	-	-	-	2	-	-	2	1,0
<i>Clostridium botulinum</i> tipo (B+E)	-	1	-	-	-	-	1	0,5
<i>Clostridium botulinum</i> não tipificado	-	-	-	-	-	2	2	1,0
<i>Salmonella</i>	6(a)+ 2(d)	5(a)	3(a)	6(a)	4(a)+ 1(b)	4(a)	31	15,3
<i>S. aureus</i>	3	3	4	4	4	2	20	9,9
<i>B. cereus</i>	1	-	1	-	2	3	7	3,5
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	-	-	1	1	0,5
<i>Salmonella</i> + <i>S. aureus</i>	1(a)	-	3(a)	1(c)	-	2(a)	7	3,5
<i>Salmonella</i> + <i>B. cereus</i>	-	-	-	1(a)	-	1(a)	2	1,0
<i>Salmonella</i> + <i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-	-	1(a)	-	1	0,5
<i>S. aureus</i> + <i>B. cereus</i>	-	-	-	-	1	-	1	0,5
<i>C. perfringens</i> + <i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-	1	-	1	0,5
Desconhecido	7	11	14	18	19	20	89	44,1
Total	24	24	32	39	33	50	202	100

(Fonte: INSA, 1998.)

Segundo o Boletim Epidemiológico publicado pelo INSA em 2014, em 2013 foi realizada uma investigação laboratorial a 19 surtos. Em 10 surtos foi identificado o agente etiológico, nestes foram reportados 183 casos humanos e 17 hospitalizações (tabela 8)⁶⁷. A enterotoxina estafilocócica foi o agente etiológico responsável por 46% dos surtos (tabela 9). Houve 1 surto do *Clostridium botulinum*, do *Clostridium perfringens* e ainda da *Escherichia coli* verotoxigénica⁶⁷. Os restantes correspondiam a intoxicações provocadas por vírus⁶⁷.

As refeições mistas e os produtos de pastelaria e bolos foram os géneros alimentícios

onde predominantemente é identificado este agente como responsável pelas intoxicações alimentares⁶⁷.

TABELA 8. NÚMERO DE SURTOS DE INTOXICAÇÕES ALIMENTARES COM O AGENTE ETIOLÓGICO IDENTIFICADO PELO INSA, DE 2009 A 2013.

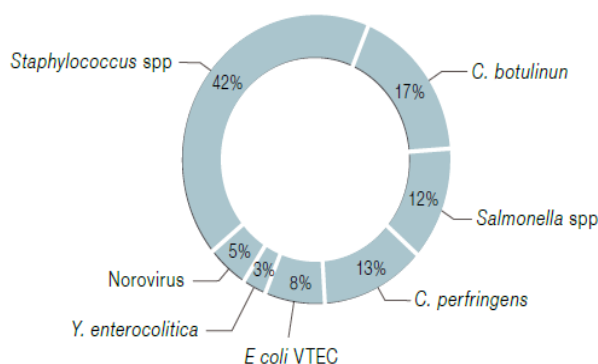
Número	2009	2010	2011	2012	2013	Total
Surtos	11	4	8	7	10	40
Casos	251	56	101	135	183	726
Hospitalizados	90	0	1	1	17	109
Mortes	1	0		0		1

(Fonte: INSA, Outubro de 2014)

Verificou-se que os fatores que mais têm contribuído para a ocorrência de intoxicações alimentares têm sido as contaminações cruzadas, procedimentos de manipulação incorretos, assim como abusos no binómio tempo/temperatura de conservação de alimentos, estando estes fatores presentes simultaneamente na maior parte dos surtos⁶⁷.

TABELA 9. AGENTES CAUSADORES DE INTOXICAÇÕES ALIMENTARES EM PORTUGAL DE 2009 A 2013.

Agente etiológico	Surtos 2013 (N=10)
Enterotoxinas estafilocócicas e/ou estafilococos coagulase positiva	5
<i>Clostridium botulinum</i>	1
<i>Clostridium perfringens</i>	1
<i>E coli</i> (VTEC)	1
Norovirus GI1	2



(Fonte: INSA, Outubro de 2014.)

Ainda neste estudo, foram analisados dados de internamento hospitalar em Portugal para determinadas doenças e agentes que são transmitidas por alimentos⁶⁷. Estes confirmaram a necessidade de melhorar a vigilância epidemiológica e laboratorial devendo esta ser obrigatória quando há doentes internados⁶⁷. Observou-se que caracterização molecular das estirpes isoladas é um passo importante para identificar surtos dispersos e determinar as fontes de contaminação na cadeia de produção alimentar⁶⁷.

Existe um elevado número de internamentos por diarreias víricas e por infeções intestinais (gastroenterites e diarreias) que não são definidas⁶⁷. Um melhor conhecimento das doenças transmitidas por alimentos ajuda a priorizar ações e a distribuir recursos na saúde e na segurança alimentar⁶⁷.

Segundo os dados publicados pelo *Scientific Report of EFSA and ECDC*, em 2013, 12 Estados Membros reportaram 386 surtos de DOA causadas pelas toxinas do *S. aureus*, o que representa 7,4% de todos os surtos⁶⁷. Houve um aumento comparado com o ano de 2012 uma vez que 14 Estados Membros reportaram 346 surtos causados pelo mesmo agente⁶⁸. A França foi o país que representou a vasta maioria dos surtos com 87% representando um aumento de 12% quando comparado com o ano anterior⁶⁸.

O número de casos reportados em Portugal também aumentou desde 2012, de 43 para 57, assim como o número de hospitalizações, que ultrapassou o número de hospitalizações de Espanha, Dinamarca e Bélgica o que é bastante preocupante^{68,69}.

TABELA 10. DOA CAUSADAS PELAS TOXINAS DO *S. AUREUS* EM 2013 NA EUROPA.

Country	Strong-evidence outbreaks			
	N	Cases	Hospitalised	Deaths
Belgium	4	59	0	0
Croatia	1	6	0	0
Denmark	2	104	0	0
France	63	680	23	0
Germany	5	59	7	0
Hungary	1	17	13	0
Netherlands	0	0	0	0
Poland	1	9	0	0
Portugal	5	57	6	0
Slovakia	1	196	0	0
Spain	9	110	3	0
Sweden	2	7	0	0
Iceland	0	0	0	0
Total (MS)	94	1304	52	0

(Fonte: EFSA, Outubro de 2013.)

8. Importância da Segurança Alimentar

Como anteriormente foi referido a maior parte das DOA resultam da ingestão de alimentos contaminados por microrganismos. Os alimentos contaminam-se em diferentes pontos da cadeia alimentar, desde a produção primária na colheita, até ao momento do consumo do alimento, em casa do consumidor⁷⁰.

As DOA podem acometer inúmeras pessoas ao mesmo tempo, resultando em graves surtos, isto deve-se essencialmente porque atualmente os alimentos são produzidos e consumidos globalmente, a migração e a facilidade de viajar das pessoas aceleram a propagação dos microrganismos patogénicos, aumentando a exposição dos consumidores aos perigos da contaminação de alimentos⁷⁰.

No último século os consumidores assistiram a um elevado crescimento da população mundial, em grande parte devido aos avanços tecnológicos na medicina, à produção massiva de produtos agrícolas e com a evolução natural da sociedade surgem as preocupações associadas à alimentação e aos possíveis perigos e doenças inerentes⁷¹. A perda de confiança do consumidor, nos sistemas de controlo, a livre circulação dos géneros alimentícios e o aumento de incidentes relacionados com a segurança dos géneros alimentícios comercializados por toda a Europa, iniciou-se devido a uma série de crises relacionadas com os alimentos no final dos anos 90. A destacar as mais mediáticas nomeadamente a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) a conhecida “doença das vacas loucas”, as dioxinas, e mais recentemente a adulteração do leite em pó com melamina na China, e a fraude dos preparados de carne moída de bovino, com carne de cavalo na Europa⁷¹. Estas crises vieram evidenciar falhas muito graves na conceção e na aplicação da regulamentação alimentar na UE⁷¹.

Após o desenvolvimento destas crises, tornou-se como imediato e prioritário a promoção de um nível mais elevado de segurança alimentar, sendo urgente aprofundar e criar mecanismos de segurança alimentar, de proteção do consumidor e da sua saúde⁷². Em 1997 a Comissão Europeia publicou o Livro Verde sobre os princípios gerais da legislação alimentar da União Europeia, que constituiu o ponto de partida para melhorar a legislação⁷². Mais tarde em Janeiro de 2000 foi criado o Livro Branco sobre a Segurança Alimentar⁷².

Com a criação do livro, foram formulados os princípios gerais sobre os quais deve assentar a política europeia em matéria de segurança alimentar, para além disso, percebeu-se que era estritamente necessário a constituição de uma Autoridade Alimentar Europeia inde-

pendente, para promover sistemas de controlo mais harmonizados a nível nacional e para se conseguir alcançar um feedback por parte dos consumidores⁷².

Em 2002, após revisão dos princípios gerais da legislação alimentar, foi elaborado o Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002 e foi criada a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA)⁷³. Esta legislação garante um elevado nível de proteção da saúde humana e dos interesses dos consumidores em relação aos géneros alimentícios, tendo em conta a diversidade da oferta, incluindo os produtos tradicionais, e assegurando, ao mesmo tempo, o funcionamento eficaz do mercado interno⁷³. Estabelece princípios e responsabilidades comuns, assegura uma base científica sólida e procedimentos organizacionais eficientes para a tomada de decisões em questões de segurança dos géneros alimentícios e dos alimentos para os animais⁷³.

Após a entrada em vigor deste regulamento, todos os operadores das empresas do sector alimentar tornaram-se responsáveis pela segurança alimentar dos géneros alimentícios que produzem e que fornecem⁷³. Deste modo, começaram a ser controladas e acompanhadas todas as fases da produção, transformação e distribuição de géneros alimentícios e de alimentos para animais, ao longo de toda a cadeia alimentar, «do prado ao prato», através da rastreabilidade do produto e da transparência dos métodos utilizados durante todo o seu processamento⁷³.

A EFSA foi criada como fonte de aconselhamento científico e de comunicação sobre os riscos associados à cadeia alimentar, com o objetivo de garantir a segurança alimentar da União Europeia e de assegurar a proteção dos consumidores, restaurando e mantendo a confiança no abastecimento de alimentos da UE⁷⁴. Compete à Autoridade a formulação de pareceres científicos independentes sobre todos os aspetos relacionados com a segurança alimentar, a gestão de sistemas de alerta rápido, a comunicação e o diálogo com os consumidores sobre questões de segurança dos alimentos e de saúde, bem como a constituição de redes com as agências nacionais e os organismos científicos⁷⁴. É a Autoridade Alimentar Europeia que fornece toda a análise necessária à Comissão que decidirá dar a resposta a aplicar⁷⁴.

Em 2005 nasce em Portugal a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) que tem como missão avaliar e comunicar os riscos na cadeia alimentar, bem como disciplinar o exercício das atividades económicas nos sectores alimentares e não alimentares, mediante a fiscalização e prevenção do cumprimento da legislação reguladora das mesmas⁷⁵.

A ASAE assume-se como a EFSA em Portugal e funciona como organismo de ligação com os outros Estados-Membros, o que permite garantir, identificar e controlar uma crise⁷⁵.

Para evitar o desenvolvimento de uma nova crise, foi instituído o princípio da precaução que estabelece a necessidade de implementação de ações de proteção prévias quando existem lacunas no que respeita à existência de provas científicas de um determinado risco para a saúde humana ou animal⁷⁶. Este princípio procura alterar as políticas e estratégias de reação para políticas de precaução, impedindo a distribuição ou mesmo a retirada do mercado de produtos suscetíveis de representarem perigo para a saúde humana⁷⁶. Os seus componentes centrais estão relacionados com a saúde pública e assentam em atuar preventivamente face à incerteza; responsabilizar os operadores das empresas do setor alimentar; explorar um largo espectro de alternativas a possíveis ações prejudiciais e incrementar a participação pública na tomada de decisão⁷⁶. Esta abordagem já está incorporada em diversos acordos internacionais e é assumida como um princípio básico⁷⁶.

De modo a determinar se um género alimentício é perigoso ou não, são consideradas as condições normais de utilização; o provável efeito imediato ou posterior sobre a saúde; a informação prestada ao consumidor; os efeitos tóxicos cumulativos e as sensibilidades sanitárias específicas de uma determinada categoria de consumidores⁷⁷. Sempre que se considere que um género alimentício é prejudicial à saúde, assume-se que a totalidade do lote desse mesmo género alimentício é potencialmente perigoso⁷⁷. O mesmo acontece com os alimentos para animais, uma vez que se considera que se um género alimentício é prejudicial à saúde humana, o mesmo não poderá ser dado nem comercializado a animais produtores de géneros alimentícios⁷⁷.

Para além da legislação, da autoridade e dos princípios formulados, foi criado o Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais (RASFF) que é responsável por informar acerca de todos os riscos para a saúde pública que provêm de géneros alimentícios, ajudando a identificar e, eventualmente a eliminar produtos que estejam no mercado⁷⁸. Cada Estado-Membro possui um centro nacional como ponto de contacto⁷⁸.

Sempre que um membro da rede dispuser de algum tipo de informação relacionada com a existência de um risco grave, direto ou indireto, para a saúde humana, essa informação é imediatamente comunicada à Comissão Europeia (CE) através deste sistema⁷⁸. A Comissão transmitirá de imediato a informação aos restantes membros da rede⁷⁸.

A indústria alimentar é um setor complexo do ponto de vista higiénico-sanitário, pois existe uma enorme variedade de alimentos manipulados, o que torna necessário a aplicação de medidas adequadas para garantir a inocuidade dos alimentos⁷⁹. Em 2004, foi elaborado o “Pacote Higiene”, constituído por um conjunto de atos que instituem regras de higiene para os produtos alimentares, entrando em vigor a 1 de Janeiro de 2006⁷⁹⁻⁸¹.

Da legislação comunitária relativa à higiene dos géneros alimentícios, aplicável a partir de 1 de Janeiro de 2006, destaca-se o Regulamento (CE) n° 853/2004 que estabelece as regras de higiene dos géneros alimentícios gerais destinadas a serem implementadas por todos os operadores⁷⁹⁻⁸¹.

Com toda esta evolução tornou-se necessário aplicar não só as boas práticas de higiene e confeção, mas também um programa de segurança alimentar preventivo, baseado no plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP)⁸².

É obrigação específica dos operadores a implementação de sistemas de autocontrolo baseados nos princípios do HACCP um sistema preventivo que permite uma gestão proactiva dos perigos para a segurança alimentar, com verificações sistemáticas e auditoria das condições de higiene das instalações, equipamentos e de manipulação dos géneros alimentícios⁸².

⁸³.

O sistema de HACCP tem como objetivo garantir a inocuidade sistemática dos géneros alimentícios. É um sistema de análise de perigos e pontos críticos de controlo com carácter preventivo, uma vez que é através dele que são identificados e caracterizados os potenciais riscos e são implementadas medidas preventivas que permitem a redução da probabilidade de ocorrência de fatores que possam pôr em causa a segurança dos produtos e consumidores^{82, 83}.

Para prevenir, reduzir ou eliminar a contaminação dos alimentos durante a sua armazenagem e preparação, todas as etapas devem ser controladas. O controlo é atingido se se cumprirem os princípios que são a base do plano HACCP⁸³.

Este é suportado essencialmente por 7 princípios, sendo eles, a análise dos perigos, a determinação dos PCC, o estabelecimento dos limites críticos para cada Ponto Crítico de Controlo (PCC), a determinação de procedimentos de monitorização para controlo de cada PCC, estabelecimento das ações corretivas a tomar quando um dado PCC se encontra fora dos limites aceitáveis, instituição de procedimentos para a verificação que evidenciem que o sistema de HACCP funciona, e por último, o estabelecimento de sistemas de registo de da-

dos que documentam todo o plano de HACCP⁸³. Para um perigo ser avaliado com um grau de risco significativo, a sua ocorrência deve ser razoavelmente provável e as consequências devem ser relativamente graves⁸³.

Uma boa estratégia de segurança alimentar inclui as boas práticas na produção alimentar e no controlo dos perigos, de acordo com a legislação vigente, mas também a educação dos consumidores com o objetivo de minimizar o risco de contaminação dos alimentos por microrganismos patogénicos⁷⁰. Para assegurar que os esforços de prevenção são efetivos, é importante perceber a etiologia da infeção e estar alerta para o perigo real, para que possam ser alterados os comportamentos que originam as más práticas que consequentemente contribuem para o desenvolvimento da doença⁷⁰.

Apesar dos surtos ocorridos em casa serem menos notificados do que os que acontecem a nível comercial e coletivo, e serem menos investigados pelos serviços de saúde, a *Food and Agriculture Organization* e a *World Health Organization* (FAO/WHO) em 2002 chegaram à conclusão que na Europa as casas privadas são o local onde a maior parte das intoxicações e infeções alimentares ocorrem⁷⁰.

Os consumidores necessitam de estar conscientes da natureza e segurança dos géneros alimentícios porque têm responsabilidades como compradores, processadores e fornecedores de alimentação⁷⁰. As práticas de manipulação na cozinha influenciam o risco de sobrevivência e multiplicação dos microrganismos assim como a contaminação cruzada de outros alimentos⁷⁰.

É relevante notar que em Portugal, é em casa que está a principal origem dos surtos⁷⁰. Durante o período 2009 a 2013, o INSA analisou os alimentos suspeitos de estarem associados a 65 casos suspeitos de surtos em que 165 pessoas foram hospitalizadas e foi notificada uma morte, 21% dos casos aconteceram em casa⁷⁰. Os alimentos mais comuns na origem destas intoxicações e infeções foram as refeições mistas, o presunto e os produtos de pastelaria⁷⁰.

9. Qualidade Alimentícia e exigências do consumidor Português

A crescente procura do consumidor por produtos da mais alta qualidade revela a necessidade da utilização de tecnologias que aumentem a vida útil dos produtos alimentícios,

e ainda proporcionem as mínimas alterações na qualidade nutricional e sensorial dos alimentos⁸⁴. Além de preservarem as características do alimento, as novas tendências devem procurar assegurar um equilíbrio entre a produção e o consumo dos alimentos⁸⁴.

Na visão atual do consumidor, o conceito de qualidade de um alimento engloba não só as características de sabor, aroma, aparência e padronização do alimento, mas também a preocupação em adquirir alimentos que não causem danos à saúde⁸⁵. Conceitualmente um alimento seguro é aquele que não oferece perigo à saúde e à integridade do consumidor⁸⁵.

A preferência por produtos de qualidade tem estimulado o desenvolvimento de novas tecnologias de conservação que produzam efeitos mínimos nos alimentos⁸⁴. O consumidor preocupa-se em adquirir alimentos que sejam o mais naturais possíveis, a ideia de estar associado, a diversos processamentos químicos, organismos geneticamente modificados, utilização de corantes, aditivos entre outras, faz com que o consumidor evite consumir estes produtos⁸⁴. Em consequência da procura maior ou menor do consumidor, a indústria alimentar teve de alterar as suas metodologias e procurou inovar os métodos propostos⁸⁴. Atualmente existem tecnologias que provocam a eliminação ou diminuição da velocidade de multiplicação de microrganismos e a inativação de enzimas, sem o aumento substancial da temperatura do produto⁸⁴. Estes novos processos promovem poucos danos aos pigmentos mantendo os compostos fenólicos que conferem o sabor e as vitaminas e, em contraste com os processos convencionais que utilizam altas temperaturas, as características sensoriais e nutricionais originais dos alimentos são mantidas, não havendo perdas significativas da qualidade do produto fresco⁸⁴.

Os consumidores estão cada vez mais exigentes quanto à elevada qualidade dos alimentos, e têm a expectativa de que tal qualidade será também mantida em nível elevado durante todo o período entre a compra e o consumo^{85, 86}. Essas expectativas são uma consequência não apenas da imposição de que o alimento deve permanecer seguro, mas também da necessidade de minimizar as alterações indesejadas das suas qualidades sensoriais^{85, 86}. As necessidades de qualidade refletem-se nos requisitos de rotulagem que os fabricantes de alimentos devem respeitar; dependendo dos países e do tipo de produto deve sempre encontrar-se o local onde é realizada a produção, validade, composição e origem^{85, 86}.

O consumidor precisa de saber o que consome, a regulamentação relativa à rotulagem dos alimentos reconhece esse mesmo direito⁸⁵. A legislação adotada pela UE neste domínio

assenta no princípio fundamental de que deve ser dada ao consumidor toda a informação essencial sobre a composição do produto, do fabricante e dos métodos de armazenagem e preparação⁸⁵. Os produtores e a indústria transformadora podem fornecer informações adicionais que devem ser exatas e não podem induzir o consumidor em erro, nem alegar que um género alimentício possui propriedades de prevenção, tratamento ou cura de doenças⁸⁵.

Apesar de as doenças relacionadas com alimentos serem principalmente causadas pela ingestão de produtos contaminados por bactérias patogénicas, fungos, vírus, parasitas ou toxinas, estas doenças também estão dependentes do facto das colheitas e dos produtos frescos terem estado ou não expostos a químicos tóxicos, metais pesados, pesticidas ou resíduos farmacológicos⁸⁷.

Uma grande quantidade da população portuguesa é alérgica a substâncias encontradas em alimentos e/ou a alguns aditivos alimentares⁸⁷. Os aditivos químicos são proibidos, a menos que a sua utilização tenha sido autorizada e comprovada exaustivamente como útil para o consumidor, pela ASAE⁸⁷. Também existe regulamentação específica para aditivos alimentares como os corantes, edulcorantes, emulsionantes, estabilizadores, espessantes e gelificantes⁸⁷. A fim de evitar quaisquer riscos para a saúde pública, a UE adotou medidas rigorosas em relação aos níveis de pesticidas e de resíduos de medicamentos veterinários que permanecem nos alimentos quando são postos à venda ao consumidor e proibiu a utilização de hormonas para estimular o crescimento dos animais, já que para os alimentos serem seguros, os animais de que provêm devem ser saudáveis⁸⁷. Foram ainda adotadas normas aplicáveis aos materiais que entram em contacto com os géneros alimentícios, especialmente as matérias plásticas, a fim de assegurar que não existe migração e partilha de componentes entre o alimento e a embalagem⁸⁷.

A União Europeia dá grande importância à preservação da saúde animal, e à prevenção de surtos de doenças animais contagiosas, como a febre aftosa, a peste suína ou a gripe aviária⁸⁷. Caso ocorra um surto de uma destas doenças, apesar das medidas de prevenção aplicadas, são tomadas disposições rigorosas para controlar e evitar a propagação da doença, por isso com o intuito de impedir que entrem na cadeia alimentar animais doentes, todos os animais e produtos de origem animal devem cumprir exigências sanitárias severas para poderem ser importados ou comercializados dentro da UE⁸⁷. Os estudos realizados mostram que os animais são mais saudáveis e permitem produzir alimentos de melhor qualidade se forem bem tratados e puderem manifestar os seus comportamentos naturais, o *stress* físico que

advém de serem criados, transportados ou abatidos em más condições pode afetar não só a saúde dos animais como também a qualidade do produto final alimentar⁸⁷.

O consumidor português pretende também que a UE respeite as diversas culturas e tradições gastronómicas existentes dentro das suas fronteiras⁸⁷. Para dar resposta a estas expectativas, a UE desenvolveu rótulos de qualidade⁸⁷. Os rótulos de Denominação de Origem Protegida (DOP) e de Identificação Geográfica Protegida (IGP) que são aplicáveis a produtos agrícolas ou géneros alimentícios estreitamente relacionados com uma região ou local específicos⁸⁷. Quando um determinado produto apresenta o rótulo IGP, significa que este possui uma característica específica ou beneficia de reputação geral associadas a uma dada área geográfica e que pelo menos uma das fases de produção, transformação ou elaboração ocorreu dentro dessa área, que cumprem determinadas especificações de qualidade⁸⁷.

Um produto que apresente o rótulo DOP possui características comprovadas que só podem resultar do ambiente natural e da metodologia da confeção dos produtores da região à qual está associado, assim, só poderá beneficiar da denominação “Queijo Serra da Estrela”, o queijo produzido na região delimitada da Serra da Estrela, que cumpre determinados requisitos precisos⁸⁷.

O mesmo é aplicado com o rótulo “Agricultura Biológica” o que determina que o género alimentício foi produzido mediante métodos biológicos aprovados que respeitam o ambiente e de acordo com normas rigorosas de produção animal⁸⁷. Neste modo de produção, os agricultores evitam sobretudo a utilização de pesticidas sintéticos e fertilizantes químicos⁸⁷.

Estima-se que por ano, ocorrem 2 milhões de mortes provocadas pela ingestão de água para consumo ou alimentos contaminados em todo o mundo⁸⁷. A situação será ainda mais crítica em 2050, onde 9 bilhões de Seres Humanos necessitarão de ter acesso a alimentos de boa qualidade⁸⁷. Simultaneamente, os principais intervenientes da cadeia de abastecimento orientam as suas atividades num ambiente complexo e global com legislação em constante mudança, aumento das restrições de rastreabilidade e da necessidade de transparência por parte dos consumidores⁸⁷.

10. Parte Experimental

10.1. Materiais

Neste trabalho foram realizadas análises à mucosa nasal dos manipuladores de alimentos, às bancadas das secções alimentares do talho, do pescado e das hortofrutícolas, e, por último seleccionaram-se 2 produtos alimentares de cada secção da superfície alimentar.

A recolha das zaragatoas nasais dos funcionários da grande superfície foi realizada dia 25 de maio de 2015 pelas 8h. As zaragatoas nasais foram processadas no centro clinico de análises clinicas de Castelo Branco da *Euromedic*.

A recolha das zaragatoas de superfície foi realizada dia 25 de maio de 2015 pelas 11h numa grande superfície alimentar da zona da Guarda, em duplicado. Seguindo o procedimento normal foram realizadas 2 zaragatoas por área às bancadas das zonas de corte dos produtos alimentares, à parte exterior das vitrines, máquinas de moer, zonas de refrigeração e caixas (tabela 11). O processamento das amostras foi efetuado no laboratório de microbiologia da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias.

As amostras alimentares foram adquiridas no dia 25 de maio de 2015 pelas 10h. Os alimentos adquiridos no talho foram o frango partido pelo manipulador, e a carne moída de suíno na hora, na secção do pescado, o peixe selecionado foi uma posta de salmão e uma posta da Perca do Nilo, e por fim na secção das leguminosas foram selecionadas a alface e os brócolos. O processamento das amostras foi efetuado no laboratório de microbiologia da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias.

TABELA II. LOCAIS ONDE FORAM RECOLHIDAS AS ZARAGATOAS DE SUPERFÍCIE.

Secção	Amostra	Local da recolha
Hortofrutícolas	1 e 1'	Caixas de legumes
	2 e 2'	Expositor das alfaces
	3 e 3'	Mesas da fruta
	4 e 4'	Bancada de exposição refrigerada das alfaces
Pescado	1 e 1'	Bancada de corte do peixe seco (bacalhau)
	2 e 2'	Parte exterior da vitrine
	3 e 3'	Bancada do peixe fresco
	4 e 4'	Local refrigerado
Talho	1 e 1'	Máquina de moagem
	2 e 2'	Bancada de corte
	3 e 3'	Parte exterior da vitrine
	4 e 4'	Bancada de exposição refrigerada

10.2. Metodologia

10.2.1. Amostras

10.2.1.1. Exsudado Nasal

A colheita foi realizada com 4 zaragatoas, duas com meio de transporte e duas estéréis. As primeiras utilizadas são as de meio de transporte para permitir maior obtenção de inóculo, as secas são utilizadas para realizar as lâminas.



FIGURA 4. REALIZAÇÃO DAS COLHEITAS DE PRODUTOS BIOLÓGICOS AOS FUNCIONÁRIOS DA SUPERFÍCIE ALIMENTAR.

Seguindo o procedimento descrito pelo INSA a zaragatoa com meio de transporte foi introduzida na narina paralelamente ao palato e deixou-se nessa posição alguns segundos de forma a absorver as secreções. Em seguida, introduziu-se um pouco mais fundo na mucosa nasal, 2 a 3 cm até se encontrar resistência e rodou-se ligeiramente a zaragatoa. O mesmo processo foi executado com a segunda zaragatoa, para então realizarmos a lâmina e ser observada a flora normal nasal ao microscópio. O procedimento é repetido para a outra narina. Após estarem devidamente secas e identificadas, as lâminas foram enviadas juntamente com as zaragatoas para o laboratório, para proceder à pesquisa de *S. aureus* resistente à meticilina. Todas as amostras foram processadas no laboratório de análises clínicas da *Euromedic* em Castelo Branco nos dias das colheitas.

Pesquisa e identificação do *S. aureus*

Os exsudados nasais, foram repicados para manitol e após incubação a 37°C durante 24h foram identificados pelo equipamento *Vitek*, que nos permite obter em simultâneo a identificação do microrganismo e as suas resistências aos antibióticos.

10.2.1.2. Superfícies

Seguindo o procedimento, a zaragatoa foi submersa em 9mL no meio de cultura de enriquecimento (Caldo Triptona Sal) que facilita a aderência dos microrganismos à superfície da zaragatoa, posteriormente pressionou-se a zaragatoa contra a parede do tubo para remover o excesso de líquido.

A colheita foi realizada com auxílio de um molde estéril com uma área de 100cm², e com a ponta da zaragatoa percorreu-se toda a área rodando-a entre o polegar e o indicador em duas direções. A ponta da zaragatoa foi assepticamente cortada e o tubo de ensaio imediatamente selado.

De acordo com as boas práticas todas as zaragatoas foram transportadas à temperatura ambiente para o laboratório da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, onde foi realizada a sementeira.

Pesquisa, Identificação e Contagem de *S. aureus*

A contagem do *Staphylococcus coagulase positivo* foi realizada, segundo as normas do INSA utilizando o método de contagem direta em placas, com sementeira e espalhamento de 1 mL de cada diluição à superfície do meio Baird Parker (BP) enriquecido com solução de

gema de ovo com telurito. Foram realizadas diluições até 10^{-3} . Posteriormente as placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas.



FIGURA 5. SEMEITEIRA DAS ZARAGATOAS REALIZADAS ÀS BANCADA DE DIFERENTES SECÇÕES ALIMENTARES DA SUPERFÍCIE.

A contagem de colônias presentes foi efetuada com base em dois critérios: colônias características (negras, convexas, brilhantes de diâmetro compreendido entre 1 e 2,5mm de diâmetro, rodeadas de um halo transparente) e colônias não características (semelhantes na aparência às colônias características, mas sem halo transparente). De cada placa contável selecionaram-se três colônias características e três colônias não características.

A estas foram realizadas sucessivamente testes de catalase, e se positiva, foi seguidamente realizado um teste de aglutinação antigénio-anticorpo para confirmar se a coagulase é positiva. Após a confirmação da presença simultânea da catalase e coagulase, procedeu-se para a realização de testes rápidos de identificação de *S. aureus* (18R-System) e colocou-se a incubar a 37°C durante 24h.

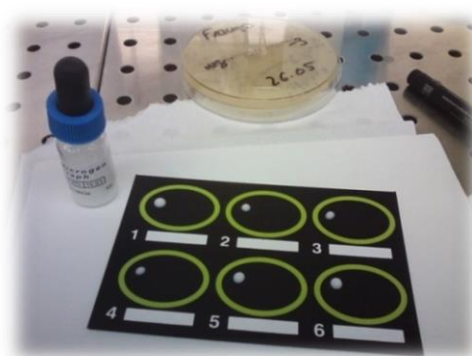


FIGURA 6. TESTES DE AGLUTINAÇÃO ANTIGÉNIO-ANTICORPO DE CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DA COAGULASE.

Este teste contém 18 poços com reagentes liofilizados que nos permitem confirmar todas as características bioquímicas do *S. aureus*, nomeadamente a descarboxilação da arginina, a hidrólise da ureia, a produção de acetoina, fermentação da maltose, do manitol, da manose e da frutose etc.

Após a incubação realizaram-se as leituras e a contagem a todas as placas. Posteriormente foram repicadas para meio de TSA para obtenção de maior inóculo, e a partir deste foram realizados os testes manuais de sensibilidade aos antibióticos, neste caso apenas à meticilina, pelo método de Kirby-Bauer. Este método consiste da difusão de um disco de antibiótico na placa semeada com a amostra, após a incubação observa-se o crescimento bacteriano, se não existir crescimento à volta do disco, significa que a bactéria é sensível, se existir crescimento bacteriano significa que esta é resistente (ausência de halo).

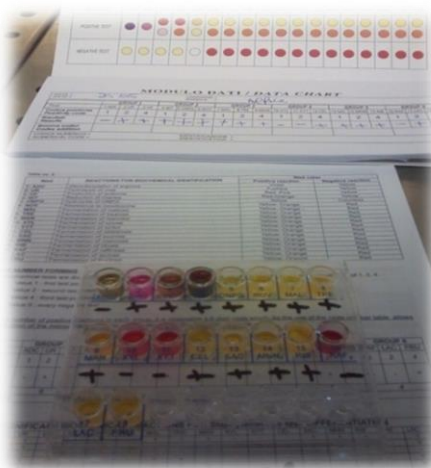


FIGURA 7. LEITURA DO KIT 18R-SYSTEM APÓS INCUBAÇÃO.

10.2.1.3. Amostras alimentares

De acordo com as boas práticas laboratoriais, todos os alimentos foram imediatamente acondicionados em câmaras de refrigeração com temperaturas entre 4°C a 6°C e transportadas para o laboratório da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, onde foram processadas pelas 14h.

Pesquisa, Identificação e Contagem de S. aureus

Após a receção das amostras, estas foram pesadas e 25gr da amostra foi imersa num saco estéril com 250mL de meio líquido Triptona Sal. No equipamento *Stomacher Circulator* procedeu-se à homogeneização da amostra com o meio de enriquecimento, durante 240sg, posteriormente as amostras foram seladas e incubadas a 37°C durante 18h.

Após 22h de incubação foram realizadas diluições até 10^{-4} e foram semeadas as placas segundo a Norma NP 4400-1:2002 utilizando o método de contagem direta em placas, com sementeira e espalhamento de 0,1 mL de cada diluição à superfície do meio Baird Parker enriquecido com solução de gema de ovo com telurito. Posteriormente as placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas.

Tal como nas zaragoas a contagem de colónias presentes foi efetuada com base em dois critérios: colónias características (negras, convexas, brilhantes de diâmetro compreendido entre 1 e 2,5mm de diâmetro, rodeadas de um halo transparente) e colónias não características (semelhantes na aparência às colónias características, mas sem halo transparente). De cada placa contável selecionaram-se três colónias características e três colónias não características.

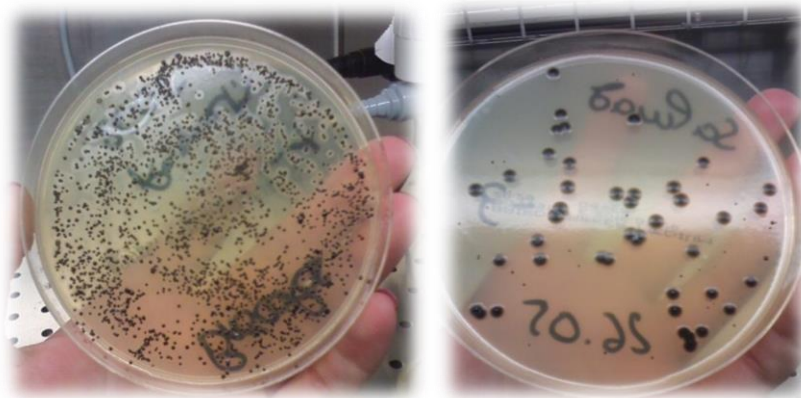


FIGURA 8. CRESCIMENTO DE *S. AUREUS* NAS PLACAS SEMEADAS COM AS AMOSTRAS "BRÓCOLOS" E "SALMÃO", RESPECTIVAMENTE.

Foram realizados os testes de catalase, e coagulase, após a confirmação da presença simultânea das duas procedeu-se à realização de testes rápidos de identificação de *S. aureus* (18R-System) e colocou-se a incubar a 37°C durante 24h.



FIGURA 9. CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO *S. AUREUS* NA AMOSTRA DOS BRÓCOLOS.

Após a incubação, realizaram-se as leituras e a todas as placas que se apresentaram como sendo positivas para *S. aureus*, foi realizada a contagem e os testes manuais de sensibilidade à metilicina, pelo método de Kirby-Bauer.

10.3. Tratamento Estatístico

Realizou-se a análise quantitativa, descritiva e comparativa dos resultados utilizando-se o *Software Statistical Package for the Social Sciences* versão 22.0 e ainda o *Microsoft Professional Excel* 2010.

10.4. Método de classificação

Após a leitura e interpretação dos resultados, as amostras foram parametrizadas como satisfatórias, não satisfatórias e potencialmente perigosas, segundo os valores de referência utilizados na avaliação da qualidade microbiológica, apresentados na Tabela 12. A classificação de amostras foi realizada de acordo com o Ministério da Saúde, monitorização do estado higiénico de superfícies em contacto com alimentos (INSA – Porto versão 1, 19-11-2001).

TABELA 12. VALOR DE REFERÊNCIA - QUALIDADE SANITÁRIA.

Qualidade Microbiológica (ufc/g)			
Microrganismo	Satisfatório	Não satisfatório	Potencialmente Perigoso
<i>S. aureus</i>	$<10^2$	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$

Fonte: INSA, 2009.

11. Resultados

Após a análise das **amostras aos manipuladores**, concluiu-se que em 26 funcionários responsáveis pela manipulação de alimentos, 8 estão colonizados pelo *Staphylococcus aureus* (30,8%), apenas 1 é colonizado por *Staphylococcus spp.* (3,8%) e nos restantes 17 funcionários, não foi isolada nenhuma estirpe potencialmente patogénica (65,4%) (tabela 13). Contudo, após a visualização do exame direto (observação da lâmina pela técnica de coloração de Gram), foi visível ao microscópio que a maior parte dos funcionários eram colonizados por cocos Gram positivo.

TABELA 13. FREQUÊNCIA E PORCENTAGEM DOS ISOLADOS DE MRSA NOS MANIPULADORES.

Colonização	Frequência	%
<i>S. aureus</i>	8	30,8
Outra bactéria	1	3,8
Não colonizados	17	65,4
Total	26	100

Dos 26 funcionários, 20 são do sexo feminino e 6 do sexo masculino. Apenas 1 dos indivíduos do sexo masculino era colonizado por *S. aureus*, sendo que os 8 restantes eram do sexo feminino (tabela 14).

TABELA 14. FREQUÊNCIA DOS MANIPULADORES COLONIZADOS POR *S. AUREUS*.

Colonização por <i>S. aureus</i>	Género		Total
	Sexo Feminino	Sexo Masculino	
Sim	7	1	8
Não	12	5	17
Outra bactéria	1	0	1
Total	20	6	26

De entre os manipuladores do sexo masculino apenas 1 é colonizado por *S. aureus* (17%), de entre os 20 indivíduos do sexo feminino 7 são colonizados por *S. aureus* (35%). De entre todos os manipuladores o indivíduo do sexo masculino representa 3,8% dos indivíduos

colonizados por *S. aureus*, e entre os indivíduos do sexo feminino, 26,9% representam a restante percentagem colonizada por *S. aureus* (tabela 15).

TABELA 15. FREQUÊNCIA RELATIVA DOS MANIPULADORES COLONIZADOS POR *S. AUREUS*.

	Manipuladores	Frequência absoluta	Frequência relativa %	%
Género Masculino	6	1	17	3,8
Género Feminino	20	7	35	26,9
Total	26	8	31	30,8

A idade dos indivíduos situa-se entre os 24 anos e aos 52 anos (tabela 16). A faixa etária dos 30 aos 39 anos apresentou uma prevalência mais elevada de colonização pela bactéria de 62,5%. A faixa dos 20 aos 29 anos representa 25% dos indivíduos colonizados, a faixa dos 40 aos 49 não teve nenhum indivíduo colonizado. E por último a faixa da idade >50 anos, apresentou uma taxa de prevalência de *S. aureus* de 12,5% (tabela 16).

TABELA 16. FREQUÊNCIA DOS MANIPULADORES COLONIZADOS POR *S. AUREUS* CONSOANTE A IDADE.

Idade (anos)	Frequência	%	Colonizados por <i>S. aureus</i>	
[20 – 30[8	30,8	2	25%
[30 – 40[13	50	5	62,5%
[40 – 50[4	15,4	0	0%
>50	1	3,8	1	12,5%

Os testes de sensibilidade a antibióticos realizados aos manipuladores demonstraram que nenhum dos *S. aureus* isolados tem ainda resistência à oxacilina e ao trimetropim e sulfametazol, contudo existe já uma grande percentagem de resistências à penicilina (75%), seguido da amoxicilina (62,5%), da eritromicina (37,5%), tetraciclina (25%), clindamicina (25%) e amoxicilina com ácido clavulânico (10%) (tabela 17 e gráfico 1). Todos os resultados intermédios foram considerados como resistentes.

TABELA 17. PERFIL DE RESISTÊNCIAS DOS ISOLADOS.

Perfil de Resistência	<i>S. aureus</i>	
	Suscetível (%)	Resistente (%)
Oxacilina	100	0
Penicilinas	25	75
Amoxicilina	37,5	62,5
Amoxicilina e Ácido clavulânico	90	10
Eritromicina	62,5	37,5
Tetraciclina	75	25
Clindamicina	75	25
Trimetropim e Sulfametazol	100	0

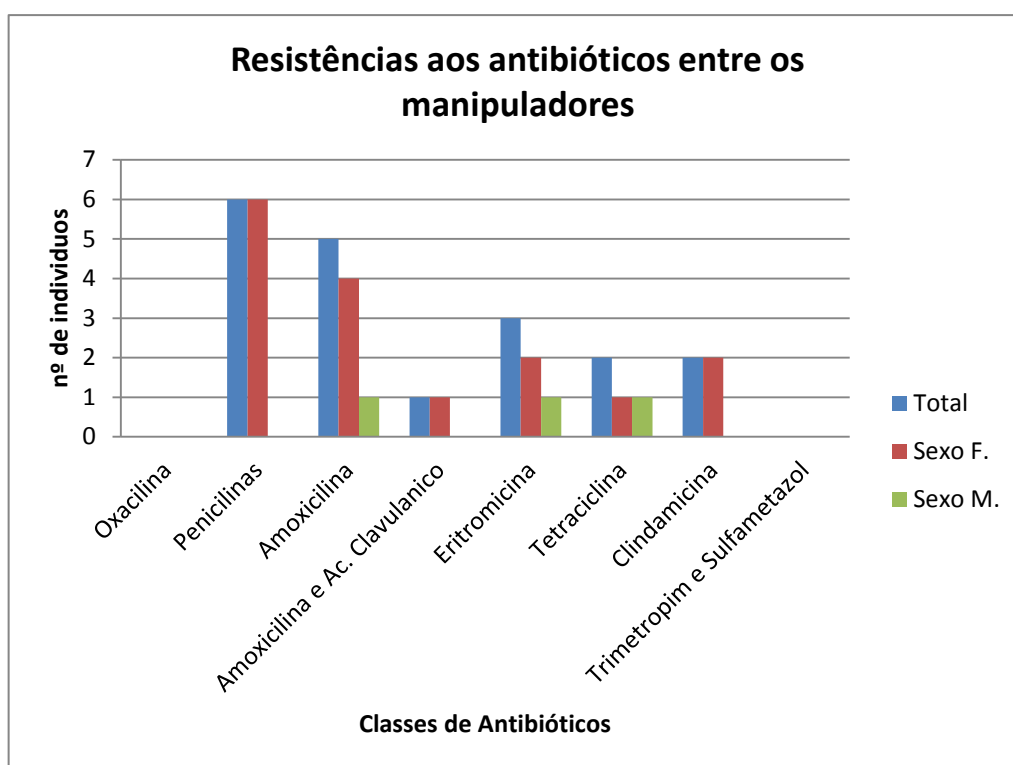


GRÁFICO I. RESISTÊNCIAS DOS ISOLADOS DE *S. AUREUS* POR GÊNERO.

Dois Indivíduos do sexo feminino apresentam resistências a 4 classes de antibióticos à penicilina, amoxicilina, eritromicina e clindamicina. 2 Indivíduos do sexo feminino, apresentam resistências simultâneas a 3 classes de antibióticos, um à penicilina, amoxicilina e amoxicilina e ácido clavulânico e o outro apresenta resistências à penicilina, amoxicilina, e à clindamicina. 2 Indivíduos do sexo feminino apresentaram resistências à classe das penicilinas (tabela 18). E por último existe um indivíduo do sexo feminino que é suscetível à ação de todas as classes de antibióticos.

TABELA 18. RESISTÊNCIAS DO *S. AUREUS* IDENTIFICADO NOS MANIPULADORES.

Resistências	Gênero masculino	Gênero feminino
1 Classe de antibióticos		25%
2 Classes de antibióticos	-	-
3 Classes de antibióticos	12,5%	25%
4 Classes de antibióticos		25%

No exame cultural das **amostras das bancadas** das diferentes secções da superfície alimentar observou-se um crescimento escasso (1 a 2 colónias) na secção dos produtos hortofrutícolas. Todas as amostras desta secção (Amostra 1 e 1', 2 e 2', 3 e 3' e 4 e 4') tiveram um crescimento muito semelhante e praticamente nulo ($<1 \times 10^6$ ufc/cm²). Estas amostras foram excluídas por não terem um crescimento bacteriano significativo, e por isso, foram eliminadas dos passos seguintes.

Na secção do pescado as amostras 2, 2', tiveram um crescimento razoável (entre 10 a 30 colónias), o mesmo não se observou nas amostras 1, 1', 3 e 3', 4 e 4' da mesma secção, onde o crescimento foi nulo. As amostras 1, 1', 3, 3', 4 e 4' foram também excluídas por inexistência de crescimento ($<1 \times 10^6$ ufc/cm²).

Por último, na secção do talho houve um crescimento notável nas amostras 2, 2' e 3, 3' e 4, 4' (entre 10 a 1800 colónias), e um crescimento escasso nas amostras 1 e 1' (apenas 2 colónias). As amostras 1 e 1' foram imediatamente descartadas.

Após realizar os testes da catalase e coagulase a todas as amostras, as amostras 4, 4' da secção do talho foram também excluídas, uma vez que a coagulase se apresentava negativa e imediatamente descartámos o *S. aureus* como o agente colonizador. Apenas a amostra 2, 2' e 3, 3' da secção das carnes e a amostra 2 e 2' da secção do pescado se mostrou bioquimicamente de acordo com as características do *S. aureus*.

Posteriormente foi realizado o teste rápido (Kit 18R-System) que confirmou a presença deste agente, e foi realizada a contagem do *S. aureus* (tabela 19).

A contagem do *S. aureus* nas superfícies revelou que as amostras da secção das carnes se encontravam com uma qualidade microbiológica “não satisfatória”, já que ambos os locais “a bancada de corte” e a “vitrine”, contêm >100 ufc/cm² de *S. aureus*. As amostras 2 e 2' de pescado correspondente à “vitrine” continham *S. aureus* <100 ufc/cm², sendo que a qualidade microbiológica é “satisfatória” (tabela 19).

TABELA 19. CONTAGEM DO *S. AUREUS* NAS BANCADAS DAS DIFERENTES SECÇÕES ALIMENTARES.

Qualidade Microbiológica (ufc/cm ²)				
Microrganismo	Secção	Satisfatório	Não satisfatório	Potencialmente Perigoso
<i>S. aureus</i>	Hortofrutícolas Amostras 1, 1', 2, 2', 3, 3', 4, 4'	<1x10	-	-
	Carnes Amostra 1, 1'	<1x10	-	-
	Carnes Amostra 2	-	1,3x10 ²	-
	Carnes Amostra 2'	-	1,2x10 ²	-
	Carnes Amostra 3	-	2,4x10 ²	-
	Carnes Amostra 3'	-	1,9x10 ²	-
	Carnes Amostra 4	<1x10	-	-
	Carnes Amostra 4'	<1x10	-	-
	Pescado Amostras 1, 1', 3, 3', 4, 4'	<1x10	-	-
	Pescado Amostra 2	4,5x10 ⁻¹	-	-
	Pescado Amostra 2'	3,5x10 ⁻¹	-	-

O exame cultural realizado às diversas **amostras alimentares** revelou um crescimento bacteriano razoável (entre 150 a 300 colónias), sendo este mais intenso nas amostras do peixe (>300 colónias), precedido das amostras de carne (entre 100 a 150 colónias). As amostras dos brócolos e da alface (até 50 colónias) demonstraram um crescimento menos significativo. Após a leitura das placas procederam-se aos testes bioquímicos, primeiro a catalase e depois a coagulase, e por último a realização do sistema de identificação rápida.

A catalase e a coagulase foi positiva para todas as colónias características (colónias negras e com halo), contudo a amostra correspondente ao frango foi fracamente positiva para

a coagulase. Após a leitura dos Kits 18R-System de identificação rápida de *S. aureus* constatou-se que todas as amostras tinham este agente presente, exceto o frango partido, que se determinou que estava colonizado pelo *Staphylococcus hominis*. A amostra de frango foi imediatamente eliminada do passo seguinte.

Após a identificação e confirmação do agente foi realizada a contagem do microrganismo (tabela 20).

TABELA 20. CONTAGEM DO *S. AUREUS* E CARACTERIZAÇÃO SEGUNDO A QUALIDADE SANITÁRIA DAS AMOSTRAS ALIMENTARES.

Qualidade Microbiológica (ufc/g)				
Microrganismo	Produto	Satisfatório	Não satisfatório	Potencialmente Perigoso
<i>S. aureus</i>	Carne moída de suíno	-	-	1,7x10 ⁴
	Frango partido	<1x10		-
	Perca do Nilo	-	-	6,2x10 ⁴
	Salmão	-	-	3,7x10 ⁴
	Brócolos	-	7,7x10 ²	-
	Alface	-	1,2x10 ³	-

Os testes de sensibilidade à meticilina das bancadas e das amostras alimentares foram realizados em simultâneo e revelaram que os *S. aureus* encontrados na perca do Nilo, na carne moída de suíno e na zaragatoa “carnes 2” têm efetivamente resistências à meticilina. Já os *S. aureus* encontrados na posta de salmão, em ambas as hortaliças e nas superfícies das bancadas correspondentes às zaragatoas “carnes 3” e “peixes 2” eram sensíveis para este antibiótico (Tabela 21).

TABELA 21. LEITURA DOS TESTES DE SENSIBILIDADE À METICILINA.

Amostras	Resistente à metilina 5ug	Sensível à metilina 5ug
Salmão		X
Perca do Nilo	X	
Carne moída de suíno	X	
Alface		X
Brócolos		X
Zaragatoa “carnes 2”	X	
Zaragatoa “carnes 3”		X
Zaragatoa “peixes 2”		X

11.1. Tratamento Estatístico

A estatística descritiva pode ser considerada como um conjunto de técnicas analíticas utilizadas para resumir um conjunto de dados, que são organizados⁷⁵. Pretende proporcionar relatórios que apresentem informações sobre a tendência central e a dispersão dos dados⁷⁵.

Os resultados foram analisados com recurso a medidas de tendência central, a média e a mediana, a medidas de dispersão, o desvio padrão e o coeficiente de variação e por último a análise gráfica.

As medidas de tendência central são indicadores que permitem que se tenha um resumo, do modo como se distribuem os dados de uma experiência, informando sobre o valor (ou valores) da variável aleatória⁷⁵.

As medidas de dispersão traduzem a variação de um conjunto de dados em torno da média, permitem identificar até que ponto os resultados se concentram ou não ao redor da tendência central de um conjunto de observações⁷⁵. Incluem, entre outras, a variância, o desvio padrão, o coeficiente de variação cada uma expressando diferentes formas de quantificar a tendência que os resultados de uma experiência aleatória têm para se concentrarem em determinados valores. Quanto maior for a dispersão, menor é a concentração e vice-versa⁷⁵.

A média é o quociente entre a soma de todos os valores observados e o número total de observações. A mediana é uma medida de localização do centro da distribuição dos dados⁷⁵. Após a ordenação dos elementos da amostra de dados, a mediana é o valor (perten-

cente ou não à amostra) que a divide ao meio, isto é, 50% dos elementos da amostra são menores ou iguais à mediana e os outros 50% são maiores ou iguais à mediana⁷⁵.

O desvio padrão é a raiz quadrada da variância, é uma medida que só pode assumir valores positivos e quanto maior for, maior será a dispersão dos dados. O coeficiente de variação dá-nos uma percentagem, e é obtido através da divisão do desvio padrão e da média⁷⁵.

Bancadas

Após a realização do tratamento estatístico às amostras, foi determinada a média, a mediana, o desvio padrão e o coeficiente de variação por sector. Através da leitura da tabela 22, podemos observar que os valores da média dos diferentes sectores são respetivamente do sector do talho (1), do sector do pescado (2) e do sector das hortofrutícolas (3), $8,5 \times 10 \text{ ufc/cm}^2$, $0,1 \times 10 \text{ ufc/cm}^2$, e $< 1 \times 10 \text{ ufc/cm}^2$. O desvio padrão é respetivamente $9,8 \times 10 \text{ ufc/cm}^2$, $0,2 \times 10 \text{ ufc/cm}^2$ e $< 1 \times 10 \text{ ufc/cm}^2$.

TABELA 22. ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS AMOSTRAS RECOLHIDAS ÀS BANCADAS.

Microrganismo	Seção	Média (ufc/cm ²)	Mediana (ufc/cm ²)	Desvio- Padrão (ufc/cm ²)	AIQ (ufc/cm ²)	Coeficiente de Variação (%)
<i>S. aureus</i> (ufc/cm ²)	Talho (1)	8,5x10	0,6x10 ²	9,8x10	1,7x10 ²	114,6
	Pescado (2)	0,1x10	<1x10	0,2x10	0,03x10	187,0
	Hortofrutícolas (3)	<1x10	<1x10	<1x10	<1x10	0

O sector do talho apresenta valores de desvio padrão e de CV inferiores, refletindo uma menor dispersão dos dados em torno da média.

Relativamente ao valor da Amplitude Interquartil (AIQ) observa-se que o sector do pescado é o sector que apresenta o valor mais baixo e o sector do talho o valor mais alto. Esta medida reflete a dispersão dos valores centrais da amostra ordenada e pode ser visualizado através do diagrama de extremos e quartis (*box plot*) onde a dimensão das caixas é maior para o sector do pescado e menor para o sector do talho, mostrando dispersões em torno da média semelhantes, com exceção das amostras do sector das hortofrutícolas, uma vez que não se obteve resultados positivos para a presença do microrganismo. O valor do AIQ para todas as amostras tem um valor $< 1 \times 10 \text{ ufc/cm}^2$, o que se deve ao valor do 3º quartil ser inferior a $1 \times 10 \text{ ufc/cm}^2$, que indica que pelo menos 75% das observações têm contagens inferiores a $1 \times 10 \text{ ufc/cm}^2$.

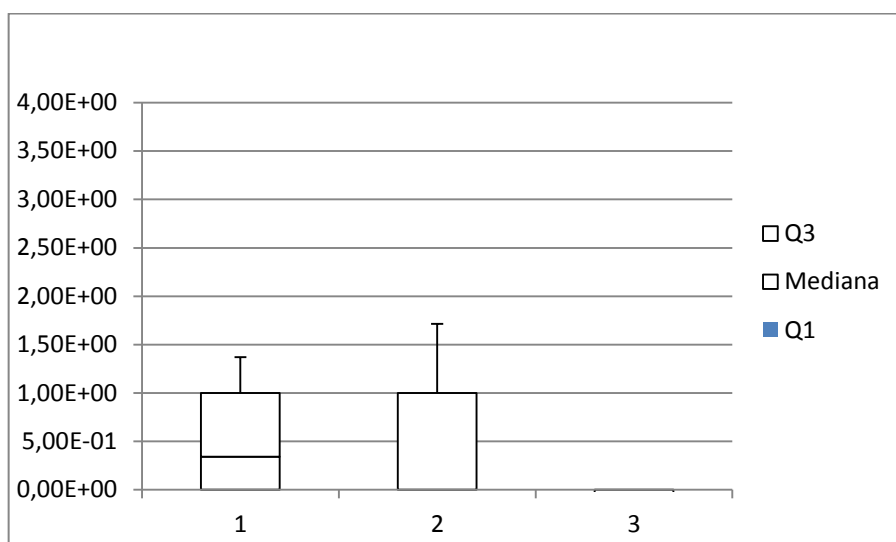


GRÁFICO 2. DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS RECOLHIDAS ÀS BANCADAS POR SECÇÃO ALIMENTAR.

Amostras Alimentares

Através da leitura da tabela 23, podemos observar que os valores da média dos diferentes sectores são respetivamente do sector do talho (1), do sector do pescado (2) e do sector das hortofrutícolas (3), $8,8 \times 10^2 \text{ ufc/g}$, $4,9 \times 10^4 \text{ ufc/g}$, e $9,9 \times 10^2 \text{ ufc/g}$. O desvio padrão é respetivamente $1,2 \times 10^3 \text{ ufc/g}$, $1,7 \times 10^4 \text{ ufc/g}$ e $3,1 \times 10^2 \text{ ufc/g}$. Tal como nas amostras às bancadas, o sector das hortofrutícolas apresenta os valores mais baixos de desvio padrão e do coeficiente de variação em relação aos outros sectores, refletindo uma menor dispersão dos dados em torno da média.

O sector do pescado apresenta uma maior dispersão dos dados, com o desvio padrão mais elevado ($1,7 \times 10^4 \text{ ufc/g}$) e o coeficiente de variação mais baixo de 34,9%.

TABELA 23. ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS AMOSTRAS ALIMENTARES.

Microrganismo	Género Alimentício	Média (ufc/g)	Mediana (ufc/g)	Desvio-Padrão (ufc/g)	AIQ (ufc/g)	Coefficiente de Variação (%)
<i>S. aureus</i> (ufc/g)	Talho (1)	$8,8 \times 10^2$	$8,8 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$8,5 \times 10^2$	141,4
	Pescado (2)	$4,9 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$	34,9
	Hortofrutícolas (3)	$9,9 \times 10^2$	$9,9 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$	31,2

Relativamente ao valor da Amplitude Interquartil (AIQ) observa-se que o sector das hortofrutícolas é o sector que apresenta o valor mais baixo ($2,1 \times 10^2 \text{ ufc/g}$) e o sector do pescado o valor mais alto ($1,2 \times 10^3 \text{ ufc/g}$). O gráfico 3 de *box plot* indica-nos que existe uma

maior dispersão dos dados no sector do talho, e podemos observar o mesmo através da tabela onde o desvio padrão e o coeficiente de variação se apresentam com valores superiores em relação aos outros sectores. Já o sector do pescado apresenta um desvio padrão bastante superior em relação ao coeficiente de variação.

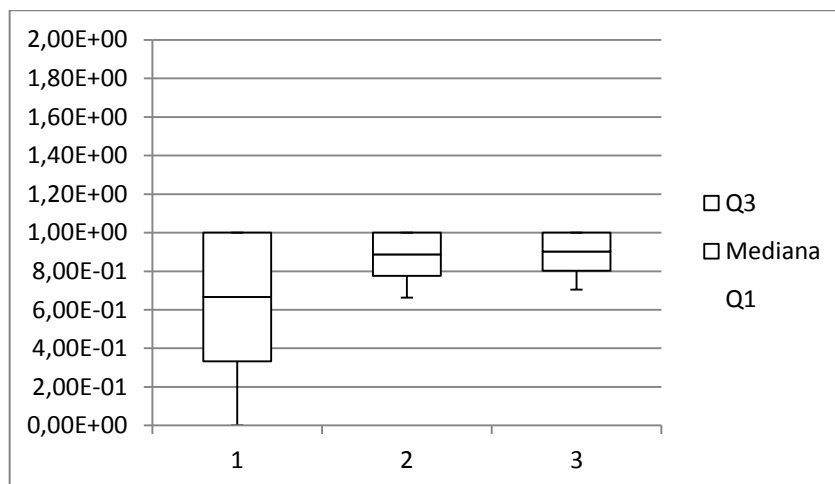


GRÁFICO 3. DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS ALIMENTARES POR SECÇÃO ALIMENTAR.

11.2. Avaliação da Qualidade Microbiológica

Uma forma de avaliar a limpeza e desinfeção das superfícies e de avaliar a qualidade microbiológica das amostras alimentares é classificar as amostras de acordo com a sua qualidade microbiológica, através da quantidade de amostras que obtiveram resultados não satisfatórios e potencialmente perigosos, de acordo com os valores referência publicados pelo INSA.

No que respeita a contagem de *S. aureus* nas bancadas do sector do talho, 50% dos resultados apresentaram-se como “não satisfatórios” para as amostras 2, 2', 3, 3' que correspondem às áreas da “bancada de corte” e “vitrine”, e os restante 50% como “satisfatória” para as áreas da “máquina de moagem” e da “bancada de exposição refrigerada” (tabela 24).

Em relação ao sector do pescado e ao sector das hortofrutícolas, não existiram áreas apresentadas como “não satisfatórias”, 100% das amostras apresentaram-se como “satisfatórias” (tabela 24).

TABELA 24. AVALIAÇÃO SANITÁRIA DAS BANCADAS DE CADA SECTOR ALIMENTAR.

Sector	Qualidade Sanitária		
	Satisfatória (%)	Não satisfatória (%)	Potencialmente perigosa (%)
Talho	50	50	0
Pescado	100	0	0
Hortofrutícolas	100	0	0

No que respeita a contagem de *S. aureus* nos alimentos, no sector do talho os 50% de “potencialmente perigoso” para a carne moída de suíno e como não foram identificados *S. aureus* na amostra de frango partida, este representa 50% das amostras “satisfatórias”, apesar de ter sido identificado outro agente (tabela 25).

Em relação ao sector do pescado obtiveram-se 100% das amostras como potencialmente perigosas, corresponde ao Salmão e à Perca do Nilo. E por último, o sector das hortofrutícolas apresentou 100% das amostras como “não satisfatórias”, representadas pela alface e pelos brócolos (tabela 25).

TABELA 25. AVALIAÇÃO SANITÁRIA DAS AMOSTRAS ALIMENTARES DE CADA SECTOR ALIMENTAR.

Sector	Qualidade Sanitária		
	Satisfatória (%)	Não satisfatória (%)	Potencialmente perigosa (%)
Talho	50	0	50
Pescado	0	0	100
Hortofrutícolas	0	100	0

12. Discussão

O *S. aureus* em Portugal tem tido uma notoriedade visível devido ao facto de estar frequentemente associado a infeções adquiridas durante os cuidados de saúde (IACS)^{24, 92}. Para além da natural agressividade desta bactéria, a sua variante resistente à meticilina (MRSA) é cada vez mais comum, principalmente na mucosa nasal dos Profissionais de Saúde⁹², que podem atuar como portadores, servindo de veículo para a passagem do microrganismo de doente a doente^{24, 92}.

Em Portugal a prevalência do MRSA no âmbito hospitalar está bem documentada^{24, 25, 26, 92} e é uma das mais altas de toda a Europa²⁴ e a prevalência das resistências na comunidade têm aumentado graças à disseminação das estirpes provenientes do âmbito hospitalar, devido aos portadores que operam como um reservatório e permitem a rápida disseminação da bactéria e das suas resistências⁸⁸⁻⁹⁰.

Diversos estudos referem a importância da colonização pelo CA-MRSA^{24, 26, 28} e já foi demonstrado que a transmissão pode ocorrer em populações relativamente "fechadas" como em escolas, creches ou instalações alimentares⁹¹.

A emergência do LA-MRSA e a sua capacidade de se alastrar para diferentes espécies animais, de os colonizar e, posteriormente, entrar na cadeia alimentar também tem sido bem documentada^{93, 94}, embora o papel do alimento como fonte de contaminação Humana seja muitas vezes desconhecida. Diversos estudos recentes têm avaliado a colonização assintomática do *S. aureus* entre pessoas saudáveis que estejam ligadas à agricultura e produção intensiva de animais⁹³⁻⁹⁵ estes estudos focam-se essencialmente em populações-alvo, como veterinários e produtores de animais⁹⁶, comunidades remotas⁹⁷, outros destacam grupos específicos tais como crianças e pessoas idosas, em Portugal inclusive, foi realizado recentemente um estudo à população infantil sadia⁹⁸.

A rápida evolução e disseminação deste microrganismo tem ainda o seu impacto no sector alimentar devido não só aos surtos alimentares que colocam em risco a saúde do consumidor, como também a perda de produtividade que leva ao desperdício de uma grande quantidade de produtos alimentares e determina a própria comercialização do produto. Devido a todos estes fatores tem existido uma maior preocupação em identificar este microrganismo e as suas resistências nas superfícies alimentares, nos manipuladores⁵⁷ nos serviços de restauração e de *catering*⁹⁹, e durante todo o processamento de produtos alimentares como o leite, a carne e o peixe^{50, 100, 101}.

É por isso, deveras importante determinar a prevalência do *S. aureus* resistente à metilina em serviços e em estabelecimentos alimentares, fazendo a ponte entre os manipuladores, os alimentos e as superfícies alimentares.

Através da observação dos resultados obtidos, percebemos que o *Staphylococcus aureus* coloniza a mucosa nasal de 8 manipuladores da superfície alimentar (30,8%), e encontra-se mais frequentemente na mucosa nasal do sexo feminino. Esta diferença apesar de parecer bastante significativa entre os géneros, o género feminino representa 35% dos manipuladores colonizados por *S. aureus* enquanto que o género masculino representa apenas 17%, contudo como os manipuladores desta superfície são maioritariamente do sexo feminino (representam 26,9% de todos os manipuladores), esta diferença não é de todo significativa.

Aquando a recolha das amostras, dois indivíduos, um do sexo masculino e outro do sexo feminino, indicaram que estavam a recorrer a antibioterapia o momento, apesar de não se determinar qual seria a ação do antibiótico, e porque terá sido prescrito, é muito provável que a ação do antibiótico determinasse que o exame cultural fosse negativo, isto porque é muito comum a prescrição de antibióticos de forma empírica, com a administração de antibióticos de largo espectro sem se determinar a etiologia da infeção¹⁹.

Apesar da bactéria não ter sido isolada em todos os indivíduos, no exame direto realizado ao microscópio, foi identificado que a maior parte dos indivíduos apresentavam cocos Gram positivos, o que indica que os indivíduos são efetivamente colonizados por alguma percentagem de bactérias coco Gram positivos que serão presuntivamente o *S. aureus*, isto pode nos indicar que aquando a colheita pode não se ter recolhido a quantidade suficiente de inóculo, ou a bactéria pode ter morrido durante o transporte até ao laboratório, apesar de terem sido respeitadas as normas das colheitas e de transporte do INSA.

Este estudo sugere ainda que a presença da bactéria na mucosa nasal não está de todo relacionada com a idade, uma vez que a faixa etária dos 30 aos 39 anos tem maior frequência de colonização da bactéria (62,5%), o que não seria de esperar, já que as pessoas colonizadas com bactérias patogénicas geralmente apresentam fatores de risco pré existentes, como é o caso da idade mais avançada. A alta prevalência da colonização do *S. aureus* em idades mais jovens pode indicar-nos que existe uma elevada incidência desta bactéria na comunidade, o que permite que um indivíduo saudável com o sistema imunitário competente seja um foco de disseminação da mesma. Por outro lado, o único indivíduo com idade superior a 50 anos

está também infetado pela bactéria, o que pode indicar que a sua idade avançada e o sistema imunitário mais debilitado poderão ser os responsáveis pela presença da bactéria.

Após a pesquisa da bactéria precedeu-se à avaliação das resistências, dos indivíduos colonizados nenhum apresentava resistências à oxacilina, contudo observaram-se altas taxas de resistências às penicilinas (75%), seguido da amoxicilina (62,5%), da eritromicina 37,5%, da tetraciclina e da clindamicina 25%, 10% de resistências à amoxicilina e ácido clavulânico e por último, todos os *S. aureus* apresentaram-se como suscetíveis à ação dos antibióticos oxacilina e trimetoprim/sulfametazol. Estes dados sugerem-nos que existe um consumo excessivo de antibióticos da classe das penicilinas e da classe dos beta-lactâmicos (amoxicilina) na zona da Guarda. Contudo, contrariamente ao esperado, os isolados são suscetíveis à oxacilina, o que indica que não deve existir uma elevada prescrição deste antibiótico, nesta zona.

Para além da elevada prevalência das resistências à penicilina e à amoxicilina, 25% dos manipuladores do género feminino apresentaram resistências simultâneas a 3 classes de antibióticos e a 4 classes de antibióticos. O género masculino apresentou 12,5% de resistências a 3 classes de antibióticos. É ainda importante referir que os indivíduos que apresentaram maior número de resistências tinham respetivamente 33 e 52 anos. Os restantes indivíduos tinham idades compreendidas entre os 28 e os 36 anos.

Estes dados são também deveras alarmantes, porque traduz-nos que pessoas mais jovens já tiveram contacto com diversas classes de antibióticos e provavelmente diversas vezes, o que fomenta o desenvolvimento de resistências e por consequente a inação dos antibióticos contra infeções que serão cada vez mais difíceis de resolver.

O manipulador tem de facto uma elevada importância em todas as etapas do processo de produção, distribuição, manipulação e comercialização do produto. Este pode facilitar a disseminação de microrganismos deteriorantes e ou microrganismos patogénicos no ambiente de trabalho, a higiene pessoal inadequada é um dos fatores que mais contribui para a ocorrência de doenças de origem alimentar⁵⁷.

As mãos são cruciais na contaminação cruzada dentro de um ambiente de manipulação de alimentos, uma vez que é através deste local que os microrganismos podem ser transferidos para os alimentos⁵⁷. Tem sido muito relatada a contaminação proveniente de manipuladores está relacionada à presença do *S. aureus*⁵⁷. A transmissão de *S. aureus* para os alimentos ocorre principalmente por intermédio dos manipuladores assintomáticos e por equipa-

mentos e superfícies dos ambientes de manipulação alimentar nos quais estes indivíduos realizam as suas atividades⁵⁷.

Uma estratégia que deverá ser adotada para controlar a elevada transmissão é a educação do pessoal através da implementação de medidas de higiene pessoal. O manipulador deve sempre lavar as mãos, ou trocar de luvas, ao iniciar o trabalho, ao mudar de tarefa, ao manipular alimentos crus, quando as mãos se apresentarem sujas e sempre que utilizar as instalações sanitárias⁵⁷.

A lavagem das mãos para ser efetiva deve ter uma duração superior a 60sgs, e devem também ser lavados os pulsos⁵⁷. A utilização de um antisséptico, a secagem das mãos com secadores, ou com toalhetes descartáveis também permitem a redução da carga microbiana, e a limpeza eficiente das mãos⁵⁷.

Em relação aos resultados obtidos das análises feitas às **superfícies** das diferentes secções alimentares, a secção das hortofrutícolas apresentou um crescimento escasso $<1 \times 10^6 \text{ufc/cm}^2$ para a pesquisa da bactéria a analisar em todas as áreas analisadas, isto deve-se à facilidade da desinfeção destas superfícies, ao contrário da bancada das carnes e dos processadores manuais.

De acordo com as regulamentações legais os utensílios e equipamentos empregados em estabelecimentos que comercializam alimentos não podem constituir risco para a saúde do consumidor, devendo possuir superfícies lisas e isentas de rugosidades e imperfeições que possam comprometer a higiene dos alimentos ou serem fontes de contaminação. De acordo com o INSA as bancadas, as superfícies de manipulação e os equipamentos e utensílios de manipulação devem conter $<10^6 \text{ufc/cm}^2$, a OMS recomenda que o limite máximo seja de cerca de $5,0 \times 10^6 \text{ufc/cm}^2$.

O mesmo não se verificou no sector das carnes onde se obteve um crescimento notável nas amostras 2, 2' e 3, 3' que correspondem às “bancadas de corte” da carne ($1,3 \times 10^7 \text{ufc/cm}^2$) e da “vitrine” ($2,4 \times 10^7 \text{ufc/cm}^2$). O principal problema relaciona-se com a superfície que deve ser lisa e de material que dificulte a contaminação dos alimentos, nomeadamente de alumínio ou aço inoxidável⁵⁷. Era visível o desgaste da bancada de um material plástico, que com o uso sistemático fica com ranhuras que permitem o aumento progressivo da população microbiana⁵⁷. Os utensílios e os equipamentos além de serem de material impermeável devem ter uma manutenção adequada e estar num estado bom de conservação⁵⁷.

Em diversos estudos verificou-se que o *S. aureus* permanece viável em superfícies secas de aço inoxidável, o que pode acarretar problemas relacionados com a contaminação cruzada⁵⁷. Outro ponto que deve ser referenciado é a utilização da mesma faca para desossar e cortar diferentes tipos de carnes, permitindo também a maior proliferação de microrganismos.

A parte exterior da vitrine apesar de parecer limpa, é normal conter uma contagem mais alta de microrganismos porque é uma superfície com a qual o consumidor tem mais acesso e mais contacto, e pretende-se que esta seja uma barreira de proteção contra a transmissão de secreções que possam ser veiculadas pelas mãos e pelo nariz.

Já as amostras 1, 1' e 4, 4', que correspondiam à máquina de moer, e à bancada de exposição refrigerada continham contagens $< 1 \times 10^6$ ufc/cm² de *S. aureus* isto apesar da contagem para o *S. aureus* ter sido negativa e parecer que a desinfecção da máquina tinha sido bem efetuada e ainda não ter sido utilizada no dia, foi identificado *Staphylococcus* coagulase negativo que pode demonstrar contaminação cruzada, e práticas de desinfecção mal efetuadas.

As superfícies utilizadas para a preparação de alimentos podem muitas vezes aparentar estar limpas, dando uma falsa percepção de segurança. A bancada de refrigeração continha estas contagens muito provavelmente porque as temperaturas mais baixas utilizadas na refrigeração inibem o crescimento microbiano.

Em relação ao sector do pescado, as amostras 1, 1', 3, 3', 4, 4' tiveram um crescimento nulo $< 1 \times 10^6$ ufc/cm², estas correspondem respetivamente às áreas da bancada de corte do peixe seco (salgado), da bancada de peixe fresco, e ao local refrigerado. A área do peixe salgado não teve crescimento talvez pelas altas concentrações de NaCl, apesar desta bactéria ter tolerância a concentrações de NaCl, esta estirpe pode ser suscetível⁹². A área escolhida da bancada do peixe fresco apresentava-se limpa e desinfetada. A área selecionada do local refrigerado ainda não continha pescado e apresentava-se limpa e desinfetada o que pode justificar a ausência de crescimento microbiano.

Ao contrário destas áreas, a área da vitrine correspondente às amostras 2, 2', teve um crescimento razoável ($4,5 \times 10^1$ ufc/cm²), esta área apresenta contagens de *S. aureus* porque a desinfecção não deverá ter sido realizada de forma adequada, contudo tal como no sector do talho, esta área serve como barreira de proteção contra a transmissão de secreções que possam ser veiculadas pelas mãos e pelo nariz.

A qualidade microbiológica das superfícies para os diferentes sectores alimentares, apresentou-se como satisfatória para o sector das hortofrutícolas de acordo com os dados referenciados pelo INSA, o mesmo se verificou para o sector do pescado (tabela 21). O sector do talho apresentou 50% dos dados não satisfatórios e 50% dos dados como satisfatórios (tabela 21).

O controlo de limpeza de equipamentos e dos utensílios é crucial dentro de uma unidade que vende produtos alimentares. A higiene do ambiente que rodeia os géneros alimentícios contribui para a manutenção da qualidade original dos alimentos, impedindo que fontes de contaminantes ou condições ambientais atuem como coadjuvantes no processo de contaminação e deterioração dos alimentos^{57, 102}.

Em relação aos dados obtidos nas análises realizadas às **amostras alimentares** das diferentes secções alimentares, na secção do talho a carne de suíno apresentou uma contagem bastante significativa de *S. aureus* ($1,7 \times 10^4$ ufc/g).

A carne de suíno foi adquirida como febras e moída na hora. Aparentavam uma cor vermelha de aspeto tenro e brilhante. A contaminação dos alimentos por *Staphylococcus aureus* está bastante descrita na literatura, as contaminações geralmente incidem em produtos perecíveis como os produtos lácteos, carnes de suíno, frango, bovino e peru, peixes e artigos de pastelaria, e geralmente acontecem como resultado de contaminações cruzadas durante o processamento do produto (por exemplo no matadouro, fase de desossar), ou durante a própria produção da espécie (aviários)¹⁰³⁻¹⁰⁵.

A carne de suíno aparece como sendo um dos alimentos mais envolvidos na transmissão de resistências desta bactéria^{104, 105}.

No frango partido não foi identificado o *S. aureus*, por isso as contagens foram $<1 \times 10$ ufc/g apesar de ter sido identificada uma outra espécie de *Staphylococcus spp* (*Staphylococcus hominis*). O frango foi adquirido inteiro e foi partido pelo manipulador, e não foi removida a pele. Não apresentava nenhum odor.

O sector do pescado foi o sector que apresentou as taxas mais altas de contaminação. A posta da Perca do Nilo continha contagens de $6,2 \times 10^4$ ufc/g de *S. aureus*, e a posta de Salmão continha contagens $3,7 \times 10^4$ ufc/g, o que é bastante preocupante para o consumidor.

Os peixes são alimentos altamente perecíveis, e se forem processados, embalados e/ou distribuídos inadequadamente, deterioram-se rapidamente e tornam-se inseguros para o

consumo humano¹⁰⁶. O pescado é atualmente uma das proteínas mais consumidas na Europa e na Ásia porque constitui uma fonte de proteínas de alto valor biológico e apresenta aminoácidos essenciais à alimentação humana¹⁰⁷.

A digestibilidade é alta, acima de 95% devido à mínima quantidade de tecido conjuntivo¹⁰⁶. O valor biológico é elevado determinado pela alta absorção dos aminoácidos, e superior ao de outras fontes animais como ovos, leite e carne bovina. Além disto, esse grupo de alimentos contém vitaminas, minerais e, sobretudo, um perfil lipídico diferenciado, por apresentar ácidos gordos poliinsaturados do grupo omega-3, principalmente os ácidos dososaenoico e eicosapentaenoico¹⁰⁶.

Apesar do peixe ser uma espécie muito rica biologicamente, é também um alimento altamente perecível, e existe um risco elevado de contaminação em praticamente todas as fases do seu processamento¹⁰⁶. As contaminações cruzadas podem ocorrer durante a descarga do produto, os diferentes métodos de captura, o tempo de arraste, as áreas de pesca, o tempo de exposição do peixe no convés, o resfriamento inadequado e a higiene do porão influenciam, significativamente, no grau de frescura da matéria-prima¹⁰⁶. Imediatamente após a captura devem-se adotar as medidas sanitárias necessárias, que evitem a proliferação microbiana, como a limpeza dos aparelhos utilizados para a pesca durante todo o transporte desde o local de pesca, as medidas de higienização das operações de transferência do peixe para os contentores, e o transporte do pescado desde o porto até a indústria¹⁰⁶.

Para além da pesca, outra fase de possível contaminação é a da manipulação do peixe por parte do manipulador, como o descasque, a descamação, a evisceração, e outras manipulações cruzadas às quais pode ser sujeito¹⁰⁶.

E por último o gelo é uma fonte de contaminação que muitas vezes é descurada, é muito importante manter a qualidade microbiológica e ter em atenção a quantidade do gelo utilizado para refrigerar o peixe¹⁰⁶. O contato dos peixes com gelo produzido com água de má qualidade e infetada com microrganismos é um dos meios mais frequentes de contaminação destes produtos. É muito importante o uso de gelo de qualidade uma vez que a deterioração do pescado na ausência de gelo é extremamente acelerada¹⁰⁶. Na ausência de gelo o pH, a produção de histamina, a produção de trimetilamina, bases voláteis totais e a multiplicação microbiana aumentam significativamente, conferindo um odor nauseabundo ao peixe¹⁰⁶.

Aquando a aquisição das amostras era óbvio o descongelamento do gelo, uma vez que foram observados locais com água no estado líquido e locais com manchas vermelhas da libertação de sangue por parte das diferentes espécies de pescado. As postas escolhidas apresentavam ainda um odor intenso apesar de estarem brilhantes e com o tom e cor normal.

Por último no sector das hortofrutícolas foi encontrado nos brócolos contagens de $7,7 \times 10^2$ ufc/g e na alface $1,2 \times 10^3$ ufc/g de *S. aureus*.

Aquando a aquisição das amostras, os brócolos apresentavam a flor seca e um pouco amarelada/acastanhada, em vez do típico verde-escuro, a alface estava húmida e aparentava ser fresca.

A contaminação microbiológica das hortaliças minimamente processadas, ou seja que não tenham sofrido nenhum tratamento térmico, podem ocorrer antes e após a colheita, através do contato com o solo contaminado, irrigação com águas contaminadas, transporte e pelas mãos dos manipuladores¹⁰⁷. Diversos autores citam as hortaliças cruas, destacando as alfices, como veiculadoras de microrganismos que provocam surtos de intoxicações alimentares¹⁰⁷.

As hortofrutícolas apresentam uma microbiota natural que provém do ambiente, sendo influenciadas pela estrutura da planta, técnicas de cultivo, transporte e armazenamento, as mudanças realizadas nas práticas agronómicas ou nas etapas de processamento, preservação, embalagem, distribuição e comercialização dos alimentos são na maior parte dos casos responsáveis pelo aumento no número de surtos ou infeções causadas por agentes patogénicos veiculados por vegetais¹⁰⁷. Estas alterações incluem o uso de fertilizantes animais que não sofrem compostagem e o uso de esgotos ou de águas de irrigação não tratadas, as quais podem contribuir para a contaminação do alimento por patogénios no campo¹⁰⁷.

A qualidade microbiológica das amostras alimentares para os diferentes sectores alimentares apresentou-se satisfatória para 50% das amostras e 50% como potencialmente perigosas para o sector talho na pesquisa de *S. aureus*, já que foram identificados outros microrganismos na amostra de frango (tabela 24). O sector do pescado apresentou 100% das amostras como potencialmente perigosas, o que é inaceitável para um sector que comercializa produtos. E por último o sector das hortofrutícolas apresentou 100% dos dados como não satisfatórios.

Tal como anteriormente foi referido o controlo de limpeza de equipamentos e das superfícies é crucial dentro de uma unidade que vende produtos alimentares. A higiene e a refrigeração do ambiente que rodeia os géneros alimentícios contribui para a manutenção da qualidade original dos alimentos, impedindo haja um processo de contaminação e de deterioração dos alimentos⁵⁷. Neste caso existiram inúmeras falhas que devem ser enumeradas, nomeadamente a refrigeração dos alimentos, na secção do pescado era determinante a refrigeração do produto, na secção das carnes existiu uma manipulação errada do produto uma vez que se encontraram bactérias da flora normal da pele do ser humano, na carne suína de frango a taxa de *S. aureus* era também bastante elevada e podia ser controlada com uma melhor refrigeração da matéria-prima.

Na secção das hortofrutícolas, os brócolos não deviam ser comercializados com o aspeto que aparentavam, de envelhecidos e com o prazo de validade a terminar. A alface apesar de aparentar estar fresca, continha bastante humidade o que pode auxiliar na manutenção e formação de biofilmes. Nesta situação é necessário alertar e educar o consumidor uma vez que a alface é ingerida crua, e para ser consumida em segurança deve-se proceder à desinfeção adequada deste produto.

O tratamento estatístico permitiu-nos efetuar um estudo comparativo das diferentes secções alimentares, as amostras efetuadas às bancadas indicaram-nos que o sector do talho teve uma menor dispersão dos dados, seguido do sector do pescado, já o sector das hortofrutícolas indicou-nos que pelo menos 75% das observações apresentaram contagens inferiores a 1×10^6 ufc/cm² para a presença do microrganismo.

Em relação às amostras alimentares tal como na das superfícies, o sector das hortofrutícolas apresentou os valores mais baixos de *n* e de CV em relação aos outros sectores, indicando a uniformidade dos dados. O sector do pescado apresenta uma maior dispersão dos dados, com o *n* mais elevado e o CV mais baixo. A maior dispersão dos dados foi no sector do talho, tal como nas amostras recolhidas às bancadas.

Como último ponto dos objetivos foi feito o apuramento a todas as amostras positivas, pretendia-se determinar se os *S. aureus* identificados apresentavam efetivamente resistências à metilina.

Apesar da amostra ser pequena, foram encontradas resistências em 50% das amostras do sector do talho (carne moída de suíno), e 50% das amostras do sector do pescado (perca

do Nilo), e ainda uma das áreas apresentou-se positiva para a contagem do *S. aureus*, e apresentou também resistências a este antibiótico (correspondente à área da bancada de corte da carne) tabela 20.

O facto de esta área apresentar resistências à metilina em simultâneo com a carne que foi manipulada no mesmo local indica-nos que muito provavelmente alguma carne manuseada na bancada era portadora desta resistência, e/ou o manipulador que manipulou a carne. Esta situação é deveras preocupante uma vez que a bancada de corte funciona como um centro de disseminação de MRSA dentro desta superfície alimentar, até ao consumidor.

A perca é também portadora de resistências à metilina o que é muito alarmante, isto indica-nos que as estirpes de MRSA chegaram já também ao sector do pescado apesar de não se poder determinar a origem se será intrínseca ao peixe ou por manipulação cruzada pelo(s) manipulador(es).

As restantes amostras apresentaram-se como sensíveis à ação do antibiótico, 50% das amostras do sector do pescado (salmão) eram sensíveis à ação do antibiótico. Todas as amostras do sector das hortofrutícolas eram sensíveis à ação do antibióticos, assim como as amostras das bancadas correspondentes às áreas exteriores das vitrines da secção do pescado e da secção do talho.

Para o consumidor existem alguns dados preocupantes, os dados mostram que existem boas práticas aplicadas dentro dos diferentes sectores mas que podem ainda ser aprimoradas, a descolonização dos manipuladores positivos para o *S. aureus* seria o primeiro passo a tomar, de seguida é sem dúvida necessário educar os manipuladores, para serem utilizados utensílios diferentes para a manipulação de diferentes produtos frescos, e a limpeza e desinfeção correta das superfícies. Assim como a troca frequente de luvas e/ou maior frequência de lavagem das mãos, ou a maior utilização de antissépticos.

E não menos importante é a educação do consumidor, o qual deve ter presente a necessidade de lavar e desinfetar os alimentos antes de os cozinhar, cozer os alimentos respeitando os binómios de temperatura de cada alimento para permitir uma diminuição/eliminação da carga microbiana, e posteriormente o alimento deve ser refrigerado no frigorífico e acondicionado em embalagens individuais e fechadas.

Após a análise dos resultados obtidos neste trabalho percebemos que é impreterível recorrer imediatamente a terapias alternativas para tratar a infecção provocada pelo *S. aureus*, tanto em animais como em Humanos, uma vez que a capacidade de evolução desta super bactéria é deveras superior há do Ser Humano, em produzir novos antibióticos que sejam eficazes.

A fagoterapia apresenta-se como uma terapia substituta da antibioterapia¹¹⁰. Os bacteriófagos utilizados nesta terapia constituem formas virais e a principal vantagem do uso destas formas em comparação aos quimioterápicos, está na sua grande capacidade de replicação, como qualquer outro vírus cada célula infetada liberta uma grande quantidade de novos vírus que têm a capacidade de infetar outras bactérias^{108, 109}.

Esta característica sugere que uma única dose de fagos pode ser o suficiente para o combate de uma grande infecção ou de um biofilme, ao contrário dos antibióticos que requerem múltiplas doses, durante dias e até semanas¹⁰⁸.

O uso da fagoterapia proporciona uma redução do aparecimento de novas estirpes resistentes aos antibióticos, e dado o seu mecanismo de ação, elimina apenas estirpes bacterianas específicas, não ocorrendo alterações na flora do infetado^{108, 109}. Por outro lado esta terapia é desvantajosa por apenas atuar numa infecção, no caso de uma infecção mista não é de todo eficiente¹⁰⁸. A única solução seria a aplicação de preparados polivalentes, formados por diferentes fagos, que possam eliminar uma maior variedade de espécies bacterianas, sobretudo em infeções mistas¹⁰⁸.

Esta terapia apresenta ainda outra grande vantagem que reside na ausência de efeitos colaterais e indesejáveis, como a destruição da microbiota comensal que compete contra as bactérias patogénicas, impedindo-as de se instalarem num dado local anatómico¹⁰⁸.

Os efeitos secundários ainda não estão esclarecidos, mas sabe-se que os fagos podem se multiplicar por dois mecanismos, o ciclo lítico e o ciclo lisogénico, o ciclo lítico determina a lise e a morte da célula hospedeira, enquanto que no ciclo lisogénico a célula permanece viva^{108, 109}. Diversos estudos têm sido realizados e apontam que após o uso da fagoterapia, há o surgimento de bactérias resistentes a alguns fagos, mas apresentam uma virulência muito inferior quando comparado com à das estirpes iniciais^{108, 109}.

Fagos são predadores naturais de bactérias, comumente encontrados no ambiente e seu uso como biocontrolador¹⁰⁹. Os estudos recentes ressaltam diversas vantagens da fago-

terapia, nomeadamente a eficiência no combate de bactérias patogénicas resistentes aos antimicrobianos, devido à indução da bacteriólise, que difere completamente da ação destes¹¹⁰. A sua grande capacidade de responder rapidamente à formação de fago-resistência do hospedeiro, pelo facto dos bacteriófagos também apresentarem a capacidade de sofrer mutação¹¹⁰, tal como as bactérias, o baixo custo de desenvolvimento da fagoterapia, uma vez que a pesquisa destes procedimentos é mais barata que a de desenvolvimento de novos antimicrobianos¹¹⁰.

Os bacteriófagos não afetam células eucarióticas, o que significa que em princípio não existam efeitos colaterais nas células do Ser Humano¹¹⁰.

A fagoterapia já foi avaliada com êxito no tratamento de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*¹¹¹, *Staphylococcus aureus*¹¹⁰, *Vibrio vulnificus*, *Enterococcus faecium*¹¹¹, *Bacillus anthracis*¹¹² e *Escherichia coli* patogénica em aves¹¹³, no homem e em bezerros com redução de sintomatologia e da mortalidade.

13. Conclusão

A presença do MRSA em alimentos para consumo embora pareça reduzida, e bastante divergente nos estudos publicados, é de facto uma importante fonte de contaminação para o Ser Humano.

Neste trabalho concluímos que a presença do *S. aureus* no sector alimentar é bastante prevalente, tanto entre manipuladores, como nas superfícies e entre os alimentos, como já tinha sido referenciado em trabalhos anteriores.

Em relação à pesquisa de MRSA entre os manipuladores, não foi detetado nenhuma resistência à meticilina, apesar das altas taxas de resistência a outros antibióticos como é o caso da penicilina e da amoxicilina.

Nas superfícies foram encontradas resistências à meticilina no sector do talho, nomeadamente na bancada de corte da carne, o que indicia que este local pode ser um foco de disseminação de resistências para o consumidor.

A prevalência de MRSA foi mais elevada entre as amostras alimentares, onde se encontraram resistências à meticilina, na perca do nilo e na carne moída de suíno, o que pode indicar o avanço do MRSA para outros ambientes que não o âmbito hospitalar.

Apesar da amostra total ser reduzida, esta representa uma pequena percentagem que merece ponderação e não deve ser de todo descartada.

Globalmente identificamos MRSA nas bancadas e nos géneros alimentícios que indica más práticas de desinfeção por parte do estabelecimento, de degradação de superfícies que ajudam na retenção e no desenvolvimento de bactérias e possivelmente de biofilmes, de contaminação cruzada e provavelmente também existiu contaminação durante o processamento das diferentes fases que determinam o produto final.

É necessário realizar estudos longitudinais ao longo de toda a cadeia alimentar, de produção até ao consumo, para conhecer as rotas de transmissão e propagação da bactéria e das suas resistências.

Devem ser adotadas medidas de controlo na utilização de antibióticos na pecuária para evitar a proliferação de resistências, e adotar medidas exigentes nas práticas de higiene e na conservação dos alimentos para evitar a necessidade de recorrer a estas terapias.

No caso das infecções no Ser Humano, os antibióticos são sempre a terapia de 1ª linha selecionada e talvez num futuro próximo se possam implementar novas terapias alternativas como é o caso da fagoterapia, que é mais barata e não traz consequências nefastas para o Ser Humano e para os animais.

14. Referências Bibliográficas

- (1) JOSÉ, J. - **Microbiological contamination in food service: importance and control**. Rev. Brazilian Soc. Food Nutr. 37(2012) 78-92.
- (2) KOCHANOSKI, S. [et.al.] – **Avaliação das condições microbiológicas de uma unidade de alimentação e nutrição**. Alim. Nut. 20(2009) 663-668.
- (3) VIEGAS, Sílvia. - **Alterações do estado de saúde associadas à alimentação: contaminação microbiológica dos alimentos**. 1ª Ed. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Departamento de Alimentação e Nutrição. Unidade de Observação e Vigilância, 2009. ISBN 978-972-8643-53-9.
- (4) MEHNDIRATTA, L., BHALLA, P. - **Use of antibiotics in animal agriculture & emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones: Need to assess the impact on public health**. Indian J. med. Res. 140 (2014) 339-344.
- (5) DELFANI, S. [et.al.] - **In silico analysis for identifying potential vaccine candidates against *Staphylococcus aureus***. Clin. Exp. Vaccine Res. 4 (2015) 99-106.
- (6) DEY, S., BISHAYI, B. - **Killing of *Staphylococcus aureus* in murine macrophages by chloroquine used alone and in combination with ciprofloxacin or azithromycin**. Journal of Inflammation Research. 8 (2015) 29-47.
- (7) ESPADINHA, D. [et.al.] - **Extensive Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between the Hospital and the Community in a Country with a High Prevalence of Nosocomial MRSA**. PLoS ONE. 8 (2013) e59960.
- (8) ECHENIQUE, D. [et.al.] - **Antibacterial activity of mulinum spinosum extracts against slime-producing *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from nasal carriers**. The Scientific World Journal. (2014) 1-6.
- (9) LAMBLET, L., BABOSA, D. - **Prevalence of *Staphylococcus aureus* colonization in renal transplant patients**. Rev Esc Enferm USP. 5 (2014) 827-33.
- (10) CERQUEIRA, E., ALMEIDA, R. - **Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin: A sistematic review**. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 72(2013) 268-281.
- (11) The Humane Society of the United States - **"An HSUS Report: Industrial Farm Animal Production and Livestock Associated MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)"**, 2013. HSUS Reports: Farm Industry Impacts on Environment and Human Health. Paper 5. [Acedido a 6 de maio de 2015]. Disponível na internet: http://animalstudiesrepository.org/hsus_reps_environment_and_human_health/5

- (12) CHATTERJEE, S., OTTO, M. - **Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves.** *Clinical Epidemiology*. 5 (2013) 205-217.
- (13) MENDES, Diana. - **Evolução da resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *Staphylococcus aureus*.** Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2013. [Acedido a 6 de Maio de 2015]. Disponível na internet <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4172/1/Tese%20Diana%20Mendes.pdf>.
- (14) UHLEMANN, C. [et.al.] - **Evolution of community and healthcare-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.** *Infect. Genet. Evol.* 21 (2014) 563-574.
- (15) FIGUEIREDO, A., FERREIRA, F. - **The multifaceted resources and microevolution of the successful human and animal pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 109 (2014) 265-278.
- (16) SILVA, Gabriela - **Avaliação das espécies e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de ovelha.** Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012. [Acedido a 6 de Maio de 2015]. Disponível na internet: <http://r1.ufrrj.br/wp/ppgcta/files/2012/11/Gabriela-Viana-da-Silva-DISSERTA%C3%87%C3%83O-2012.pdf>.
- (17) PATERSON, G. [et.al.] - **Incidence and characterisation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from nasal colonisation in participants attending a cattle veterinary conference in the UK.** *PLoS ONE*. 8 (2013) e68463.
- (18) PATIL, S. [et.al.] - **Self-medication practice and perceptions among undergraduate medical students: A cross-sectional study.** *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 8 (2014) 20-23.
- (19) THRIEMER, K. [et.al.] - **Antibiotic prescribing in DR Congo: A knowledge, attitude and practice survey among medical doctors and students.** *PLoS ONE*. 8 (2013) e55495.
- (20) BRICKS, L. - **Judicious use of medication in children.** *Jornal de Pediatria*. 79 (2003) 107-114.
- (21) CHANG, Q. [et.al.] - **Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be?** *Evolutionary Applications*. 1 (2014) 1-8.
- (22) NEYRA, R. [et.al.] - **Multidrug-resistant and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hog slaughter and processing plant workers and their community in North Carolina (USA).** *Environ. Health Perspect.* 122 (2014) 471-477.
- (23) WANG, W. [et.al.] - **Development of intramammary delivery systems containing lasalocid for the treatment of bovine mastitis: impact of solubility improvement on safety,**

efficacy, and milk distribution in dairy cattle. Drug Design Development and Therapy. 9 (2015) 631–642.

(24) SOUSA, A., M. - **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a public health nightmare.** Salus Scientia. 4 (2012) 18-30.

(25) European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC] - **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013.** Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), 2014. Disponível na internet: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>.

(26) AIRES-DE-SOUSA, M. - ***Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA): um problema dentro e fora dos hospitais portugueses.** Magazine da SPM. 2(2012) 29-33.

(27) European Food Safety Authority (EFSA) - **Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 - Part A: MRSA prevalence estimates.** EFSA Journal. 7 (2009); 11:1376.

(28) KADARIYA, J., SMITH, T., THAPALIYA, D. - ***Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An ongoing challenge in Public Health.** BioMed Research International. 5(2014) e827965.

(29) TAVARES, Ana. - **Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) in Portugal: Origin, epidemiology and virulence.** Oeiras: Universidade Nova de Lisboa, 2014. [Acedido a 22 de Março de 2015]. Disponível na internet: <http://run.unl.pt/handle/10362/14236>.

(30) Direção Geral da Saúde. - **Prevalência de infeção adquirida no hospital e do uso de antimicrobianos nos hospitais portugueses: Inquérito 2012.** Lisboa, 2013. [Acedido a 22 de Março de 2015]. Disponível na internet: <http://www.dgs.pt/ms/3/pagina.aspx?codigoms=5514&back=1&codigono=00020034AAAAAAAAAAAA>

(31) POMBA, C. [et.al.] - **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates with indistinguishable Apal restriction patterns in colonized and infected pigs and humans.** J. Antimicrob. Chemother. 65(2010) 247- 2484.

(32) EFSA. - **Preventing community and nosocomial spread and infection with MRSA ST398: PILGRIM project.** Journal. 7(2009):1376.

- (33) CHRISTIANSEN, T., M. [et.al.] - **Genome-wide high-throughput screening to investigate essential genes involved in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* sequence type 398 survival.** PLoS ONE. 9 (2014) e89018.
- (34) RIJEN, M., M., L. [et.al.] - **Livestock-Associated MRSA carriage in patients without direct contact with livestock.** PLoS ONE. 9 (2014) e100294.
- (35) OTTO, M. - ***Staphylococcus aureus* toxins.** Curr Opin Microbiol. 1(2015) 32-37.
- (36) SANTOS, A. [et.al.] - ***Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance.** J. Bras. Patol. Med. Lab. 43(2007) 413-423.
- (37) POWERS, M., WARDENBURG, J. - **Igniting the Fire: *Staphylococcus aureus* virulence factors in the pathogenesis of sepsis.** LoS Pathog. 10(2014) e1003871.
- (38) VITKO, N., SPAHICH, N., RICHARDSON, A. - **Glycolytic dependency of high-level nitric oxide resistance and virulence in *Staphylococcus aureus*.** mBio 6(2015) e00045-15.
- (39) PEREIRA, L. - **Impetigo - A review.** An. Bras. Dermatol. 89(2014) 293-299.
- (40) ORTEGA, E., ABRIOUEL, H., LUCAS, R., GÁLVEZ, A. - **Multiple roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance.** Toxins. 2(2010) 2117-2131.
- (41) KRAKAEUR, T., STILES, B. - **The staphylococcal enterotoxin (SE) family.** Virulence. 4(2013) 759-773.
- (42) PEREIRA, V. [et.al.] - **Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal.** Food Microbiology. 26(2009) 278-282.
- (43) RAHIMI, E. - **Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran.** Brazilian Journal of Microbiology. 44(2013) 393-399.
- (44) ADETUNJI, V., ADEDEJI, A., KWAGA, J. - **Assessment of the contamination potentials of some foodborne bacteria in biofilms for food products.** Asian Pac. J. Trop. Med. 7(2014) S232-S237.
- (45) FABRES-KLEIN, M. [et.al.] - **An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*.** BMC Veterinary Research. 11(2015) 3.

- (46) GUTIÉRREZ, D. [et.al.] - **Incidence of *Staphylococcus aureus* and Analysis of Associated Bacterial Communities on Food Industry Surfaces.** Applied and Environmental Microbiology. 78 (2012) 8547-8554.
- (47) FEBLER, A. [et.al.] - **Germany and food products of poultry origin in *Staphylococcus aureus* isolates from food characterization of methicillin-resistant.** Appl. Environ. Microbiol. 77 (2011) 7151-7157.
- (48) FANG, H., CHIANG, P-H., HUANG, Y-C. - **Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST9 in pigs and related personnel in Taiwan.** PLoS ONE. 9 (2014) e88826.
- (49) WIERZCHOWSKA, W. [et.al.] - **Retail ready-to-eat food as a potential vehicle for *Staphylococcus spp.* harboring antibiotic resistance genes.** Journal of Food Protection. 77 (2014) 993-998.
- (50) VÁSQUEZ-SÁNCHEZ, D., LÓPEZ-CABO, M., SAAÍ-BUSQUIZA, P., RODRÍGUEZ-HERRERA, J. - **Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain).** International Journal of Food Microbiology. 157(2012) 286-296.
- (51) COSTA, W. [et.al.] - **Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Raw Meats and Prepared Foods in Public Hospitals in Salvador, Bahia, Brazil.** Journal of Food Science. 80 (2015) 147-150.
- (52) OGATA, K. [et.al.] - **Commercially Distributed Meat as a Potential Vehicle for Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.** Applied and Environmental Microbiology. 78 (2012) 2797-2802.
- (53) SERGELIDIS, D. [et.al.] - **Prevalence, distribution, and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat salads and in the environment of a salad manufacturing plant in Northern Greece.** Czech J. Food Sci. 30 (2012) 285-291.
- (54) LAMBRECHETS, A., HUMAN, I., DOUGHARI, J., LUES, J. - **Bacterial contamination of the hands of food handlers as indicator of hand washing efficacy in some convenient food industries.** Pak J Med Sci. 30 (2014) 755-758.
- (55) DAGNEW, M., TIRUNEH, M., MOGES, F., TEKESTE, Z. - **Survey of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and intestinal parasites among food handlers working at Gondar University, Northwest Ethiopia.** BMC Public Health. 12 (2012) 837.
- (56) PASSOS, E. [et.al.] - **Isolation of *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in a food-borne disease outbreak in Vale do Ribeira region.** Rev. Inst. Adolfo Lutz. 71(2012) 713-717.

- (57) JOSÉ, J. – **Microbiological contamination in food service: importance and control.** J Brazilian Soc. Food Nut. 37 (2012) 78-89.
- (58) FONSECA, J., PEREIRA, M. - **Bacterial contamination of sandwiches sold in snack bars: cross-sectional study carried out in Brasilia.** Epidemiol. Serv. Saúde. 22(2013) 509-516.
- (59) Eurosurveillance Editorial Team (EFSA). - **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013.** J. 13(2015) 3991.
- (60) ARGUDÍN, M., MENDOZA, M., RODICIO, M. - **Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins.** Toxins. 2(2010) 1751-1773.
- (61) SCHELIN, J. [et.al.] - **The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment.** Virulence. 2(2011) 580-592.
- (62) JOHLER, S. [et.al.] - **Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by egc-Encoded Enterotoxins.** Toxins. 7 (2015) 997-1004.
- (63) MADAHÍ, H., ROSTAMI, F., RAHIMI, E., DEHKORDI, F. - **Prevalence of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* Isolated From Chicken Nugget in Iran.** Jundishapur J. Microbiol. 7 (2014) e10237.
- (64) HAIT, J. [et.al.] - **Prevalence of enterotoxins and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from a bakery involved in a second staphylococcal food poisoning occurrence.** Journal of Applied Microbiology. 117 (2014) 866-875.
- (65) ZELENY, R. [et.al.] - **Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: Feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment.** Food Chemistry. 168 (2015) 241-246.
- (66) BAPTISTA, Paulo., ANTUNES, Christine. -**Higiene e Segurança Alimentar na Restauração - volume II: Avançado.** Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, S. A., 2005, ISBN: 972-99099-8-9.
- (67) CALHAU, Maria. - Boletim Epidemiológico: **Toxinfecções alimentares, um problema de Saúde Pública.** 7ª Ed. Lisboa INSA, 2014. [Acedido a 28 de Março de 2015]. Disponível na internet: http://repositorio.insa.pt/retrieve/6687/Boletim_Epidemiologico_Observacoes_7_2014.pdf.
- (68) Scientific Report of EFSA and ECDC - **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013.** EFSA Journal. 13(2015):3991.

- (69) Scientific Report of EFSA and ECDC - **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012**. EFSA Journal. 12(2014):3547.
- (70) VIEGAS, Sílvia. - **Segurança Alimentar: Guia de boas práticas do consumidor**. 1ª Ed. Lisboa: INSA, 2014. ISBN 978-972-8643-96-6.
- (71) WHO - **Food safety and foodborne illness**, 2007. [Acedido a 20 de Maio de de 2015] Disponível na internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>
- (72) Comissão das Comunidades Europeias (2000). **Livro Branco sobre a Segurança dos Alimentos, Bruxelas**, b12.l.2000 COM (1999) 719 final.
- (73) Regulamento (CE) nº 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. Jornal Oficial das Comunidades Europeias L 31/1.
- (74) European Food Safety Authority (EFSA) (2011), [Acedido a 21 de Maio de 2015] Disponível na internet: <http://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa.htm>.
- (75) Autoridade Segurança Alimentar Económica (2011). **Riscos e alimentos. Alimentos de Origem Animal**. Lisboa: Ministério da Economia e Inovação. [Acedido a 21 de Maio de 2015] Disponível na internet: <http://www.asae.pt>.
- (76) WHO (2003). **The precautionary principle: protecting public health, the environment and the future of our children** (pp63-64). [Acedido a 21 de Maio de 2015] Disponível na internet: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/91173/E83079.pdf.
- (77) Europa (2011). **Segurança dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais**. [Acedido a 21 de Maio de 2015] Disponível na internet: http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/general_provisions/f80501_pt.htm.
- (78) RASFF, HACCP and Risk Assessment in food control (n.d). **Rapid Alert System Foodstuff and Feed (RASFF)** (pp.9). [Acedido a 21 de Maio de 2015] Disponível na internet: [http://www2.health.gov.sk/redsys/rsi.nsf/0/483E04A90108AC7EC12570050028C173/\\$FILE/Attachment_Guidelines.pdf](http://www2.health.gov.sk/redsys/rsi.nsf/0/483E04A90108AC7EC12570050028C173/$FILE/Attachment_Guidelines.pdf).
- (79) Regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo à higiene dos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia L 139 de 30 de Abril de 2004.

(80) Regulamento (CE) n° 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. Jornal Oficial da União Europeia L 139 de 30 de Abril de 2004.

(81) Regulamento (CE) n° 1441/2007 da comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n° 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.

(82) FDA (2011). **Hazard Analysis and Critical Control Point Principles and Application Guidelines**. [Acedido a 21 de Maio de 2015] Disponível na internet: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/HazardAnalysisCriticalControlPointsHACCP/HACCPPrinciplesApplicationGuidelines/default.htm#app-a>.

(83) AMORIM, J., AMORAIS, R. - **Guia para controlo da segurança alimentar em restaurantes europeus**. Lisboa, INSA, 2013. [Acedido a 6 de Junho de 2015] Disponível na internet: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Paginas/GuiaContrSegAlimRestEur.aspx>.

(84) NOVAES, S. - **Influência das novas tecnologias de conservação sobre os alimentos de origem animal**. Revista Científica eletrónica de Medicina Veterinária. 19(2012) 1679-7353.

(85) PORTOCARRERO, A., KOSOSKI, R. - **Produção integrada no Brasil: Agropecuária sustentável alimentos seguros**. Brasil, 2009. ISBN 978-85-99851-50-0

(86) GRAÇA, P., GREGÓRIO, J. - **Evolução da política alimentar e de nutrição em Portugal e suas relações com o contexto internacional**. Revista SPCNA. 18(2012)79-96.

(87) World Health Organization Regional Office for Europe. Health 2020: a European policy framework supporting action across government and society for health and well-being. 2012. [Acedido a 6 de Junho de 2015] Disponível na internet: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0009/169803/RC62wd09-Eng.pdf.

(88) TAVARES, A. [et.al.] - **High prevalence of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community in Portugal: evidence for the blurring of community-hospital boundaries**. J Clin Microbiol Infect Dis. 32(2013):1269-83.

(89) TERESA, C. [et.al.] - **Contamination of Public Buses with MRSA in Lisbon, Portugal: A Possible Transmission Route of Major MRSA Clones within the Community**. PLoS One. 8(2013): e77812.

(90) MONECKE, S. [et.al.] - **Extensive Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between the Hospital and the Community in a Country with a High Prevalence of Nosocomial MRSA**. PLoS One. 8(2013): e59960.

- (91) RIJEN, M. [et.al.] - **A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus***. PLoS One. 6(2011):e17936.
- (92) RODRIGUES, F. [et.al.] - **Screening of *Staphylococcus aureus* in Occupational Health Center of Vila de Rei – Portugal and their families**. Revista de Saúde Amato Lusitano. 32(2013) 15-18.
- (93) VANDENDRIESSCHE, S. [et.al.] - **Prevalence, risk factors and genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carried by humans and animals across livestock production sectors**. J. Antimicrob. Chemother. 68(2013)1510-1516.
- (94) CLEEF, B. [et.al.] - **Livestock-associated MRSA in household members of pig farmers: transmission and dynamics of carriage, a prospective cohort study**. PLoS One. 10(2015):e0127190.
- (95) FRIESE, A. [et.al.] - **Occurrence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey and broiler barns and contamination of air and soil surfaces in their vicinity**. Appl Environ Microbiol. 79(2013) 2759-66.
- (96) ISHIHARA, K. - **Epidemiological analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staff of companion animals in Japan**. J. Vet. Med. Sci. 76(2014)1627-1639.
- (97) SARROU, S. [et.al.] - **Dissemination of Methicillin-Susceptible CC398 *Staphylococcus aureus* strains in a rural Greek area**. PLoS One. 10(2015):e0122761.
- (98) TAVARES, A., LEÃO, R., MIRAGAIA, M., LENCASTRE, H. - **Large screening of CA-MRSA among *Staphylococcus aureus* colonizing healthy young children living in two areas (urban and rural) of Portugal**. BMC Infect. Dis. 10(2010) 110.
- (99) UDO, E., MUFTI, S., ALBERT, J. - **The prevalence of antimicrobial resistance and carriage of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food handlers in Kuwait City restaurants**. BMC Research Notes. 2(2009):108.
- (100) TENHAGEN, A. [et.al.] - **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cattle food chains - prevalence, diversity, and antimicrobial resistance in Germany**. J Anim Sci.92(2014):2741-51.
- (101) SNYDER, L., NIEBUHR, E., DICKSON, S. - **Transfer of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from retail pork products onto food contact surfaces and the potential for consumer exposure**. J Food Prot. 76(2013) 2087-92.

- (102) HO, J., O'DONOGHUE, M., BOOST, M. - **Occupational exposure to raw meat: A newly-recognized risk factor for *Staphylococcus aureus* nasal colonization amongst food handlers.** International Journal of Hygiene and Environmental Health. 217(2014) 347- 353.
- (103) ABDALRAHMAN, L., WELLS, H., FAKHR, M. - ***Staphylococcus aureus* is more prevalent in retail beef livers than in pork and other beef Cuts.** Pathogens. 4(2015) 182-198;
- (104) HANSON, B. [et.al.] - **Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa.** Journal of Infection and Public Health. 4(2011) 169-174.
- (105) BENEKE, B. [et.al.] - **Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a fresh meat pork production chain.** Journal of Food Protection, 74(2011) 126-129.
- (106) SOARES, K., GONÇALVES, A., SOUZA, L., SILVA, J. - **Search of *Staphylococcus aureus* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) stored in ice].** Acta Veterinaria Brasilica. 6(2012) 239-242.
- (107) SANTOS, G. [et.al.] - **Qualidade da alface comercializada no município de Botucatu.** SP. Revista Ibero. Tec. 11(2010) 67-74.
- (108) PAISANO, A., BOMBANA, A. - **Phage therapy as an alternative in the fight against endodontic infections.** Rev Gaúcha Odontol. 58(2010) 243-252.
- (109) GONÇALVES, G., FILHO, R. - **Fagoterapia: uma opção de controlo biológico para a salmonelose aviária.** Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP. 10(2012) 06-13.
- (110) MATSUZAKI, S. [et.al.] - **Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases.** Journal of Infection and Chemotherapy. 11(2005) 211-219.
- (111) HANLON, W. - **Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections.** International Journal of Antimicrobial Agents. 30(2007) 118-128.
- (112) TORO, H - **Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chicken.** Avian Diseases. 49(2005) 118-124.
- (113) JOERGER, R. - **Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages.** Poultry Science. 82(2003) 640-647.