

Diana Milheiro Dias

Presença de *Staphylococcus aureus* em alimentos

Ciências da Nutrição

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2022

Presença de Staphylococcus aureus em alimentos

Diana Milheiro Dias

Presença de Staphylococcus aureus em alimentos

Ciências da Nutrição

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto 2022

Diana Milheiro Dias

Presença de *Staphylococcus aureus* em alimentos

Declaro para os devidos efeitos ter atuado com integridade na elaboração deste Trabalho de Projeto, atesto a originalidade do trabalho, confirmo que não incorri em plágio e que todas as frases que retirei de textos de outros autores foram devidamente citadas ou redigidas com outras palavras e devidamente referenciadas na bibliografia.

Diana Milheiro Dias

(Diana Milheiro Dias)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do grau
de licenciado em Ciências da Nutrição.

Orientadora:

Prof.^a Doutora Maria João Coelho

I. Agradecimentos

Em primeiro lugar, um agradecimento especial à minha família, sobretudo aos meus pais, por me apoiarem nos momentos mais difíceis, pelo carinho, e por sempre acreditarem em mim. Sou agradecida pelo sacrifício que fizeram ao longo destes anos e também por me ensinarem a não desistir.

Ao meu namorado, pelo amor, pelo carinho, pela paciência, por acreditar em mim e por me ajudar a acreditar em mim mesma e nas minhas capacidades.

À colega e amiga Joana, pela companhia e momentos inesquecíveis, pela ajuda e apoio nos momentos mais difíceis e também por celebrar comigo as minhas vitórias e conquistas.

À minha orientadora, prof.^a Doutora Maria João Coelho, pela disponibilidade, por todas as sugestões e ideias que foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Fernando Pessoa e a todos os seus docentes de Ciências da Nutrição, por todos estes anos, pelo percurso académico incrível que me proporcionaram, por todos os ensinamentos que me fizeram evoluir tanto a nível profissional como a nível pessoal.

Um obrigado muito especial a todos!

Índice

| | |
|--|------|
| Índice de Tabelas..... | VII |
| Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas..... | VIII |
| Resumo:..... | XI |
| Abstract: | XII |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 2. Métodos..... | 4 |
| 3. <i>Staphylococcus aureus</i> | 5 |
| 4. Biofilme..... | 7 |
| 4.1 Terapêutica e prevenção contra biofilmes de <i>staphylococcus aureus</i> | 9 |
| 5. Detecção de <i>Staphylococcus aureus</i> | 10 |
| 6. Doenças de origem alimentar causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> | 11 |
| 7. Enterotoxinas..... | 13 |
| 7.1 Nomenclatura..... | 14 |
| 7.2 Fatores que afetam o desenvolvimento de enterotoxinas..... | 15 |
| 7.3 Modo de ação..... | 16 |
| 7.4 Detecção de enterotoxinas..... | 17 |
| 8. MRSA (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina)..... | 19 |
| 9. Tratamento..... | 21 |
| 9.1 Vacinas e Anticorpos Monoclonais:..... | 22 |
| 9.2 Componentes naturais contra infeções contra <i>staphylococcus</i> sp..... | 22 |
| 10. Prevenção..... | 25 |
| 11. Probióticos e <i>S. aureus</i> | 26 |
| 12. Conclusões..... | 28 |
| 13. Bibliografia..... | 30 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Fatores que afetam o crescimento e produção de enterotoxinas por <i>S. aureus</i> _____ | 16 |
|--|----|

Índice de Figuras

| | |
|-----------------------------------|---|
| Figura 1 – Diagrama de Fluxo_____ | 4 |
|-----------------------------------|---|

Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas

AFLP- Amplified Fragment Length Polymorphisms (Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados)

ASAE- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

CA-MRSA- MRSA associado à pecuária

CDC- Centers for Disease Control and Prevention (Centros de Controle e Prevenção de Doenças)

DOA- Doenças de Origem Alimentar

EFSA- Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos

Fem- Factors essential for methicillin resistance (Fatores essenciais para a resistência à meticilina)

HACCP- Hazard Analysis and Critical Control Point (Análise de Perigos e controle de pontos de críticos)

HA-MRSA- MRSA associada à saúde

HIV- Human Immunodeficiency Virus (Vírus da imunodeficiência humana)

LAB- *Lactobacillus*

LA-MRSA- MRSA associada à comunidade

MLST- Multilocus dequence typing (Tipagem de sequência *multilocus*)

MRSA- Meticilin-resistant *Staphylococcus Aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina)

NaCl- Cloreto de sódio

OMS- Organização Mundial de Saúde

PBP2a- Penicillin-binding protein 2a (Proteínas de ligação à penicilina 2a)

PCR- Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PFGE- Pulsed-field gel electrophoresis (Eletroforese em gel de campo pulso)

QMRA- Quantitative Microbial Risk Assessment (Avaliação de riscos microbiana quantitativa)

S. aureus- *Staphylococcus aureus*

SAGs- Proteínas superantigénios

SEA- Enterotoxina estafilocócica A

SEB- Enterotoxina estafilocócica B

SEC- Enterotoxina estafilocócica C

SEs- Enterotoxinas estafilocócicas

SFP- *Staphylococcus* food poisoning (Intoxicação alimentar por *Staphylococcus*)

ST5-II- Clone de MRSA Nova Iorque/Japão

ST247-I- Clone de MRSA Ibérico

TGI- Trato Gastrointestinal

TSST-1- Toxina 1 do choque tóxico

Presença de *Staphylococcus aureus* em alimentos

Diana Milheiro Dias¹, Maria João Coelho²

¹Estudante finalista do 1º ciclo de Ciências da Nutrição da Universidade Fernando Pessoa

²Orientadora do Trabalho Complementar. Docente da Universidade Fernando Pessoa

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Rua Carlos da Maia, 296 | 4200 – 150 Porto

Tel. +351 225074630; E-mail: 35241@ufp.edu.pt

Contagem de palavras: 11251

Número de tabelas:1

Número de figuras: 1

Resumo:

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é uma bactéria de Gram positivo, oportunista, que é frequentemente encontrada na mucosa humana, nomeadamente nas fossas nasais e na pele, e é responsável por várias infeções.

O objetivo deste trabalho é analisar e perceber a presença de *S. aureus* e MRSA nos alimentos e foi redigido sob a forma de revisão bibliográfica.

Houve uma pesquisa na base de dados PUBMED, Scielo e Science Direct nas quais foram selecionados artigos para análise. E também foi feita uma pesquisa na EFSA e ASAE, para poder especificar mais.

Dado que nos dias de hoje a prevalência destas infeções ainda continua alta, apesar de a taxa de mortalidade ter baixado, é importante haver prevenção dos aparecimentos das mesmas.

A prevenção passaria então por uma boa higiene a nível pessoal e também pela manutenção da segurança alimentar através do cumprimento de algumas regras apresentadas neste trabalho.

Palavras chave: *S. aureus*, alimentos, MRSA, prevenção, contaminação de alimentos e tratamento.

Abstract:

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is an opportunistic, Gram-positive bacteria that is frequently found on the human mucosa, namely in the nasal passages and on the skin, and is responsible for various infections.

The objective of this work is to analyze and understand the presence of *S. aureus* and MRSA in foods and was written in the form of a literature review.

There was a search in the PUBMED, Scielo and Science Direct databases in which articles were selected for analysis. A survey was also carried out at EFSA and ASAE, in order to be able to specify more.

Given that the prevalence of these infections is still high today, despite the fact that the mortality rate has dropped, it is important to prevent their appearance.

Prevention would then involve good personal hygiene and also the maintenance of food safety through compliance with some rules presented in this work.

Keywords: *S. aureus*, food, MRSA, prevention, food contamination and treatment

1. Introdução

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é um patógeno humano oportunista capaz de aderir a superfícies bióticas e abióticas e formar biofilmes, tornando as células mais protegidas e de difícil remoção (1,2).

O contacto de alimentos com superfícies que contenham biofilme microbiológico têm uma maior propensão para a sua contaminação, podendo levar a infeções associadas (3)

Staphylococcus aureus é uma bactéria de Gram positivo, descrita pela primeira vez em 1880/84 (4,5), responsável por grande parte das infeções nosocomiais como bacteremia, endocardite, infeções osteoarticulares e infeções da pele e também por grande parte das infeções de origem alimentar (6,7).

S. aureus é uma bactéria comensal que costuma estar presente, de maneira assintomática, na pele, garganta e narinas de indivíduos saudáveis. Estima-se que 30-50% da população humana seja portadora desta bactéria. (8)

As enterotoxinas produzidas por *S. aureus*, fazem parte de uma grande família de exotoxinas pirogénicas e causam síndromes muito idênticas a choques tóxicos que estão por muitas vezes implicados em intoxicações alimentares, alergias e também doenças autoimunes (7,9). A intoxicação alimentar causada por estas enterotoxinas tem a peculiaridade de apresentar sintomas que se manifestam rapidamente, com cerca de 30 minutos após a ingestão de alimentos contaminados. (10)

As principais enterotoxinas encontradas nos alimentos são então as enterotoxinas estafilocócicas A e B (SEA e SEB); e estão associadas à principal causa de contaminação alimentar e consequente infeção. (9)

Estas enterotoxinas, são caracterizadas por serem solúveis em água e soluções salinas, mas especialmente por serem altamente resistentes ao calor (7). Por este motivo, é de extrema importância que a sua identificação seja feita e, por isso, os métodos utilizados devem ser rápidos, sensíveis e precisos (5).

Entre as espécies de *Staphylococcus*, *S. aureus* é a mais importante em função da sua capacidade de adquirir resistência a antibióticos (como por exemplo, os *S. aureus* resistentes à meticilina, conhecidos como MRSA) e da sua patogenicidade (11). O MRSA foi identificado pela primeira vez em 1940/1960 (3,5,9,27) e tornara-se um problema para

a saúde pública, uma vez que são responsáveis por um número elevado de infeções (13) e o tratamento existente começou a não ser eficaz.

Os probióticos são definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades seguras e adequadas podem ter benefícios para a saúde do hospedeiro (11,12) e são fortemente utilizados na dieta humana como suplementos e recentemente para o desenvolvimento de novos produtos alimentares.

Os probióticos que colonizam o intestino humano são numerosos e, muitas vezes a microbiota intestinal está associada ao aumento da resistência a infeções, ativação do sistema imune e síntese de nutrientes (13).

Lactobacillus é um exemplo de um membro importante das bactérias probióticas que desempenham papéis essenciais de imunomodulação na mucosa intestinal. É referido em inúmeros estudos como uma possível medida preventiva nas doenças causadas por *Staphylococcus aureus*, uma vez que a ingestão deste probiótico combate a diarreia causada por infeções causadas por microrganismos patogénicos (14).

Cada vez mais, o consumidor procura alimentos mais naturais, que tenham uma longa data de expiração com o menor número de conservantes possíveis. O aumento da procura de alimentos convenientes, para a indústria alimentar tornou-se um enorme desafio uma vez que é necessário garantir a segurança alimentar, inclusive com *s. aureus*, que tem uma enorme capacidade de se expressar através de enterotoxinas em alimentos principalmente de origem animal, como carne, leite, pescado e ovos. Portanto, perceber o mecanismo de ação desta bactéria e também os seus meios ótimos de desenvolvimento é de extrema importância para que seja possível prevenir infeções de origem alimentar(15,31).

O principal objetivo desta pesquisa consiste em realizar uma revisão da literatura, sobre a prevalência de *Staphylococcus aureus* em intoxicações alimentares dando a conhecer melhor como estas ocorrem, e, também, apresentar uma orientação geral sobre o tratamento destas intoxicações e medidas de segurança alimentar a respeito da manipulação/armazenamento e confeção de alimentos de modo a impedir a propagação desta bactéria.

Outro objetivo deste trabalho, será apresentar as características dos probióticos utilizados como parte da prevenção e tratamento das infecções causadas por *Staphylococcus aureus* e por MRSA.

2. Métodos

Este trabalho é uma revisão bibliográfica, que pretende sistematizar informação sobre a presença de *S. aureus* nos alimentos e, como tal, não foi feito qualquer tipo de trabalho de carácter experimental.

Foi inicialmente feita uma pesquisa na plataforma PUMED, que fornece vários artigos de interesse para a saúde pública. Os termos utilizados para a pesquisa foram *Staphylococcus aureus*, food poisonings, probióticos, MRSA, prevention e treatment.

Para diminuir o número de artigos e, também, para tornar a pesquisa mais específica, foram selecionados artigos que especificassem mais os objetivos do tema e foram aplicados filtros como o idioma dos artigos, que no caso foi inglês e Português, estudos realizados em humanos, o texto do artigo disponível na totalidade e publicados nos últimos 10 anos (2011-2021).

Para além desta pesquisa, foi obtida informação através do website da EFSA, ASAE e CDC (Centers for Disease Control and Prevention, do português, centro de controlo e prevenção de doenças).

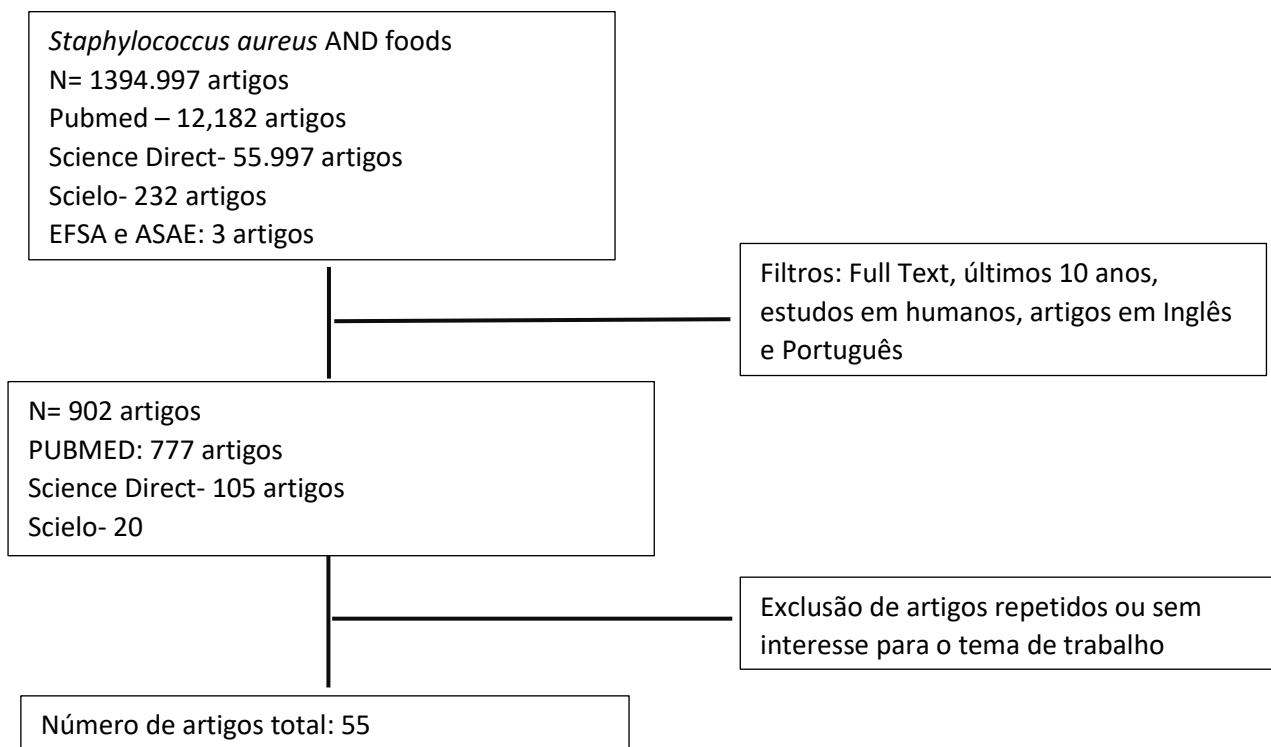


Figura1: Diagrama de Fluxo

3. *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos são bactérias esféricas, não esporuladas, que além de anaeróbias facultativas, são também Gram-positivo e catalase positivo. A sua classificação é feita de acordo com a sua capacidade de produzir coagulase, podendo ser distinguidas por *staphylococcus* coagulase-positivo, como é o caso de *S. aureus* e coagulase-negativo. Estes últimos têm uma capacidade fermentativa na carne e produtos á base de leite, portanto apresentam uma capacidade enterotoxinogénica, podendo levar à intoxicação alimentar (16,27).

O nome *Staphylococcus* é oriundo do grego “*staphyle*” e “*cocci*” que têm por definição “cacho de uvas” e *aureus* significa ouro, o que traduz a cor e aparência das colónias de *S. aureus* quando identificadas (27,30).

S. aureus é então uma bactéria anaeróbia facultativa, o que significa que consegue fazer a respiração se o oxigénio estiver presente, mas também consegue realizar a fermentação ou respiração anaeróbia na sua ausência (16,27,30).

S. aureus tem a capacidade de se desenvolver em ambientes com temperaturas entre 7 e 46°C e tem uma temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37°C (17). 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 o valor de pH entre 6,0 e 7,0. Em relação à atividade da água, *S. aureus* tolera valores mais baixos do que as restantes bactérias e em concentrações de NaCl até 10%. Acima dos 15% o seu desenvolvimento começa a ser mais lento (17).

Esta bactéria contém diversos fatores de virulência, nomeadamente proteínas (superantigénios (SAGs), toxinas esfoliativas e citotoxinas), enzimas (preoteases, hidrólases, coagulases) e proteínas de superfície (proteína A, fibronectinas e fatores de agregação) (7,18,48). Os polissacarídeos capsulares, reduzem a fagocitose por neutrófilos e aumentam a colonização e resistência bacteriana (48).

Algumas proteínas presentes na membrana celular de *S. aureus*, desempenham um papel importante na absorção de nutrientes, pelo que, por exemplo o ferro, poderá estar menos disponível para a bactéria, se estiver ligado a estas proteínas. Para além do ferro foram

destacados o zinco e o manganês, que, no caso do manganês é utilizado como cofator da enzima superóxido dismutase, que por sua vez pode aumentar a resistência ao stress oxidativo e morte por neutrófilos (48).

S. aureus, poderá estar presente nas mamas, mucosas e pele de mamíferos. A glândula mamária que está infetada, em animais que produzem leite para consumo humano, contamina o leite e derivados como a manteiga e o queijo, o que poderá significar uma redução da produção e na qualidade destes alimentos e conseqüentemente uma perda económica (5). Para além disso, os tratadores destes animais, ao contactarem com o leite também podem ficar contaminados na pele e espalhar para as mucosas aumentando a disseminação da bactéria (2,5,17,27).

As principais fontes de contaminação humanas são as fossas nasais, a pele, o trato gastrointestinal e a axila e os principais reservatórios são as unhas, pele e cabelo (5,17,39), e a infeção aparece sob a forma de abcesso ou mesmo de infeção do folículo piloso (19).

No geral, a contaminação de alimentos também acontece devido ao contacto com a pele feridas cutâneas (infetadas ou não) ou por tosse e espirros de pessoas contaminadas, sendo que normalmente ocorre durante a produção dos mesmos (17,27).

Se houver a disseminação de *S. aureus* por bacteremia, pode levar à ocorrência de endocardite, osteomielite hematogénica aguda, meningite ou mesmo infeção pulmonar (5,19,27).

As bacteremias são a manifestação por *S. aureus* mais bem descrita, nomeadamente em situações industriais (19). Na população que trabalha na indústria, a incidência de indivíduos que são diagnosticados com bacteremia por *S. aureus* é de 10-30 em 100.000 indivíduos, por ano. No entanto estes números foram diminuindo ao longo do tempo devido à progressão nos métodos de desinfeção no manuseamento (21).

Já na população fora da indústria estes números são menos conhecidos apesar de se saber que são mais prevalentes em crianças (21).

Estudos demonstram que a idade é um fator determinante na incidência desta doença, sendo que predomina no primeiro ano de vida, diminui na idade jovem/adulta e vai aumentando com o envelhecimento (16,21,32). Por exemplo, em indivíduos com 70 anos ou mais, esta incidência é de 100 pessoas por cada 100.000, enquanto que em jovens adultos militares americanos era de apenas de 4,7. São mais prevalentes em homens do

que em mulheres, não havendo uma causa relacionada. A incidência de bacteremia, também está relacionada com a etnia, por exemplo, nos estados unidos a incidência de MRSA invasivo foi maior na população negra (66,5 por 100.000) do que na população branca (27,7 por 100.000) (21).

Até 2015 a população infetada como vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentou uma incidência elevada de bacteremia, com cerca de 494-1960 por 100.000 pessoas por ano. A mesma situação verifica-se em doentes dependentes de hemodiálise, devido à utilização de um catéter. No entanto, outros fatores que comprometam o sistema imune podem aumentar a probabilidade do aparecimento de bacteremia por *S. aureus* (21).

4. Biofilme

S. aureus possui a capacidade de formar biofilmes que são compostos por multicamadas de células, o que torna a bactéria capaz de resistir à dessecação, ao calor e ser mais tolerante aos desinfetantes comuns do que a maioria das bactérias podendo permanecer em superfícies, utensílios e equipamentos utilizados na preparação de alimentos, o que constitui uma importante fonte de contaminação.

O Biofilme surge como crescimento e desenvolvimento de microrganismos bacterianos em superfícies (1,2,3,20,24,25).

O crescimento envolve quatro etapas, adesão á superfície, produção de matriz extracelular, formação de colónias e desenvolvimento. (2,19,20,24).

Numa fase inicial, *S. aureus* liga-se a uma superfície biótica ou abiótica utilizando uma variedade de mecanismos incluindo adesinas de superfície e ácidos teicóicos presentes na parede celular (23). Um fator determinante nesta adesão é a hidrofobicidade da superfície em questão (24).

A maturação do biofilme é possível devido à complexa constituição da matriz, que é rica em polissacarídeos, proteínas, lípidos entre outros nutrientes que permitem o desenvolvimento do biofilme ao facilitar a adesão dos microrganismos (3,20,23,24).

Devido a esta complexidade tridimensional, torna-se difícil para os antimicrobianos a penetração no biofilme (20,22), conferindo ao biofilme uma resistência à resposta imunitária do hospedeiro e também a antimicrobianos (21,22).

Por este motivo, o tratamento destes biofilmes pode ajudar na erradicação de algumas bactérias, no entanto não conseguem erradicar totalmente o microrganismo, ocorrendo assim infecções refratárias (20).

Após a formação inicial do biofilme, o sistema imunológico do hospedeiro vai combater contra as bactérias invasoras, podendo levar a danos nos tecidos e potenciar o desenvolvimento do biofilme. Outro problema comum é o aparecimento de biofilmes em materiais médicos e implantes associados a uma contaminação cruzada que pode ocorrer durante uma cirurgia e, conseqüentemente, promover colonização na pele ou outros locais do corpo do hospedeiro (23,24). Portanto, indivíduos imunodeprimidos ou recém-nascidos, apresentam maior probabilidade de desenvolver infecções bacterianas associadas a dispositivos (24). Neste caso, pode haver o controle através da utilização de desinfetantes, como por exemplo, álcoois, compostos de amônio e compostos clorados. No entanto é necessário respeitar o limite de utilização do produto bem como evidenciar se este é corrosivo ou não e tomar as medidas de precaução necessárias (25).

Outros tipos de infecção associados a biofilmes são a ferida crônica e a endocardite infecciosa. Na primeira o tempo de cicatrização é prolongado e na endocardite, o aparecimento de biofilme pode estar associado ao implante cardíaco (23,24,27).

Para além das infecções apresentadas, pode ocorrer a bacteremia, que se trata de uma infecção que ocorre no sangue, apresenta-se como uma das mais perigosas uma vez que pode trazer por consequência sepses ou mesmo a morte (24).

Existem inúmeros fatores que têm sido demonstrados para explicar a resistência de biofilmes a agentes antimicrobianos: a presença de células bacterianas que apresentam taxa metabólica e crescimento mais baixas levando a uma maior tolerância a antibióticos direcionados para a parede celular bacteriana e também a inibidores da síntese de DNA ou proteínas. Outro fator é o facto da matriz extracelular do biofilme, ter a capacidade de agir como um absorvente, reduzindo a quantidade de antimicrobiano disponível para interagir com as células do biofilme (20,23).

4.1 Terapêutica e prevenção contra biofilmes de *Staphylococcus aureus*

Uma vez que os biofilmes normalmente resistem durante um longo período de tempo nas superfícies sem serem alvo de qualquer tipo de detecção, muitas vezes não são eliminados pelo sistema imunológico, o que pode tornar o tratamento basicamente insustentável. Por este motivo os métodos mais adotados são a remoção física do biofilme ou remoção cirúrgica, bem como terapia antimicrobiana prolongada (23,26,41).

Outro protocolo de tratamento de biofilmes é a utilização de bacteriófagos que como tem um mecanismo bactericida, diminuí a probabilidade de formação de resistência. Além disso, a lisina de bacteriófagos mostrou-se eficaz no rompimento enzimático do biofilme, tornando este tipo de tratamento mais eficaz (24).

O principal mecanismo de prevenção para o aparecimento de Biofilmes é o impedimento da fixação de bactérias nas superfícies, através da modificação das superfícies de biomateriais, como catéteres e implantes. Para além desta abordagem também é possível a utilização de vacinas (23,41).

Como exemplo de possíveis modificações de superfícies existem os revestimentos, que podem com nanopartículas de prata que, no entanto, alguma citotoxicidade para o hospedeiro devido á formação acelerada de trombina e aceleração da ativação plaquetária (23,24,41).

Existem ainda revestimentos em aço inoxidável e titânio, que são ao mesmo tempo revestidos com antibióticos como a vancomicina, para assim prevenir o aparecimento de *S. aureus*. No entanto, existe a potencial desvantagem de poder haver a adesão de *S. aureus* resistentes a antibióticos, mesmo apesar de haver combinação (41).

5. Detecção de *Staphylococcus aureus*

Apesar de infeções por *S. aureus* não ser tão frequente, esta bactéria continua a representar um perigo para a saúde. Como tal a sua deteção é importante para reduzir os riscos inerentes à saúde pública e à segurança alimentar(27).

S. aureus produz colónias acinzentadas ou amarelo-dourado intenso e está associado á produção de coagulase. A coagulase é uma enzima que coagula o plasma sanguíneo humano. Como tal, um dos métodos de identificação *S. aureus* é através da prova de coagulase que pode ser realizada em lâmina ou em tubo. (26) Existe ainda o teste da termonuclease, que é identificada num teste simples e rápido. No entanto, tal como no teste de coagulase, apresenta a desvantagem de poder apresentar falsos negativos, uma vez que há outras espécies de *Staphylococcus* que são coagulase e termonuclease positivo (26).

S. aureus é a única espécie do género *Staphylococcus* capaz de produzir um fator de aglutinação, então, o desenvolvimento de testes para a identificação deste fator permitiu fazer a distinção entre *S. aureus* e os restantes patógenos do mesmo género (17, 26).

Para além destes, existe a possibilidade de utilizar a técnica de isolamento e enumeração de *S. aureus*. Consiste na utilização de meio de cultura como o Manitol Salt Sgar, fora do contexto alimentar ou o meio de Baird-Parker, no contexto alimentar, onde as colónias são normalmente circulares, lisas e de coloração cinza escuro ou negra. (24) Estas são as principais técnicas laboratoriais utilizadas e são feitas através de amostras de alimentos ou de vómito do doente (26).

A técnica da reação da cadeia polimerase (PCR) pode ser utilizada, uma vez que foi desenvolvido um protocolo para a amplificação do gene que codifica uma endonuclease produzida especificamente por *S. aureus* (26).

Por fim, existe a deteção através de biossensores que são dispositivos analíticos que integram um elemento de reconhecimento biológico, como enzimas, e também material biológico como ácidos nucleicos e recetores celulares, modificando a resposta biológica através de um transdutor que gera um sinal (27).

6. Doenças de origem alimentar causadas por *Staphylococcus aureus*

Segundo a OMS as doenças de origem alimentar (DOA) são descritas como doenças causadas por microrganismos ou outros agentes que penetram no organismo do hospedeiro através da ingestão de alimentos, causando vários sintomas entre os quais vômitos e diarreia (28,29).

Em 2009, foram relatados nos EUA, cerca de 5500 surtos de DOA, que afetaram cerca de 49.000 pessoas e em 46 mortes, sendo que 249 desses surtos foram provocados por *S. aureus* e por toxinas bacterianas (*Staphylococcus* e *Clostridium*) (29). Atualmente, estima-se que *S. aureus* causa cerca de 241,000 doenças por ano também nos Estados Unidos (29).

Em 2015, foram relatados em 26 estados-membros da União Europeia, 4362 surtos de origem alimentar, que por sua vez originaram 45.874 casos que apresentaram sintomas, dos quais resultaram 3892 internados e 17 mortes. Neste caso, os surtos foram classificados por tipo de agente (46).

A gravidade da doença depende da quantidade de alimentos contaminados ingeridos, da quantidade de toxina presente no alimento e também do estado de saúde do indivíduo inclusive do seu estado nutricional, uma vez que o estado nutricional do doente afeta diretamente o seu sistema imune e a capacidade de resposta (16,26,29). São necessárias apenas 100 ng de enterotoxina para provocar SFP (*Staphylococcus* food poisoning). (5,30,46).

As DOA microbianas podem ser subdivididas em: intoxicações alimentares, que são causadas por toxinas previamente produzidas nos alimentos e também infecções alimentares que são causadas quando o organismo tem células viáveis para o desenvolvimento de determinado patogénico (26).

O aumento de DOA que se tem observado tem várias causas, mas as mais importantes são o aumento de refeições feitas fora de casa, o aumento da capacidade de adaptação dos microrganismos, o controlo deficiente da qualidade e segurança alimentar e o aumento da globalização do mercado alimentar (25,30,31).

A intoxicação alimentar por *S. aureus* dá-se de duas a oito horas (16,21,26) logo após a ingestão de alimentos contaminados e os sinais e sintomas são caracterizados por náuseas, vômitos, diarreia e sudorese (5,17,18,26,27,28,30,33,39,46), que normalmente desaparecem após 24-48 horas, uma vez que é uma doença autolimitada (16,18,28,29,46). Se houver um prolongamento dos sintomas e perdas grandes de fluído, poderá haver sinais de desidratação e hipotensão (29). Pode também ocorrer sintomas menos típicos como por exemplo cefaleias, prostração e febre. (17,26,35).

O exame gastroscópico de pacientes com intoxicação aguda por enterotoxinas estafilocócicas (SE), mostra danos gastrointestinais com hiperemia da mucosa, erosão, edema da mucosa, irritação muscular e petéquias (5,7).

A hospitalização raramente é requerida, mas, no entanto, quando é necessária, diz mais respeito a lactentes, idosos e pacientes imunodeprimidos (34,29,41).

O diagnóstico de DOA causada por *S. aureus*, baseia-se na identificação da presença de enterotoxinas, ou da recuperação da bactéria de restos de alimentos (29).

Os alimentos que estão relacionados com DOA variam de acordo com o país em questão, devido ao facto de o padrão alimentar variar também (29).

Estes podem ser contaminados desde a etapa de produção até ao seu consumo (3), e os que aparecem mais associados à intoxicação alimentar por *S. aureus* são os de origem animal, como o leite e queijos, podendo dever-se à contaminação do leite com mastite, ou à contaminação durante ou depois do processamento pelos manuseadores se estes estiverem contaminados e não houver boas práticas de higiene, e se os alimentos forem sujeitos a temperaturas de armazenamento entre 10 e 45°C antes do consumo. Como exemplo podem-se referir os alimentos com recheios de carne, as saladas preparadas com ovo ou marisco, os bolos com recheio, o fiambre e os gelados (7,16,26,28,30,35).

Para além destes alimentos temos ainda a carne e de origem vegetal temos as batatas e a massa (26).

O aparecimento de DOA não está apenas associado aos alimentos em si, mas também á preparação de alimentos com muito tempo de antecedência, às más temperaturas de refrigeração dos alimentos e de confeção e reaquecimento dos alimentos, má higiene pessoal e exposição prolongada dos alimentos na altura de servir os alimentos, que pode promover o crescimento e acumulação bacteriana (29,40).

7. Enterotoxinas

As enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus* (SEs) são proteínas de baixo peso molecular e são as principais causas de intoxicação alimentar por *S. aureus* uma vez que têm uma influência direta sobre o trato gastrointestinal (TGI), causando danos no mesmo, isto é, devido a uma resposta inflamatória (5). As SE, são resistentes à ação de enzimas proteolíticas como a pepsina e a tripsina e, assim, conseguem passar do TGI para o local de ação (16,22,26,47) e apresentam citotoxicidade, afetando as células intestinais e causando os sintomas típicos de uma gastroenterite (37). Para além da intoxicação alimentar, também estão associadas a alergias e doenças autoimunes (7).

Para além de atuarem a nível gastrointestinal também atuam como superantígenos, estimulando a proliferação das células T não específicas, promovendo o aumento de produção de citocinas inflamatórias, alterando o meio extracelular e promovendo a inativação e destruição do antígeno podendo levar a supressão da atividade enterotogénica (7,47).

A produção de enterotoxina ocorre entre os 10 e 45°C e são proteínas hidrossolúveis e termoestáveis, que se torna importante ter em conta, porque muitas vezes o processamento térmico dos alimentos, como a pasteurização, não é suficiente uma vez que a toxina continua presente e ativa (9,16,21,22,30,47), a menos que sejam expostos a uma elevada temperatura por um intervalo de tempo bastante prolongado (28).

A destruição da enterotoxina obtém-se pelo tratamento a 100°C durante pelo menos 30 minutos ou autoclavagem (7). A produção de enterotoxina ocorre em ambientes com valores de pH entre 5,2 e 9,0 e, por isso, para além da resistência térmica apresentam também resistência a pH ácidos e a altas concentrações de ácido láctico o que significa que o seu crescimento está facilitado em alimentos que contenham este componente (16,37). As radiações ionizantes (raios gama) e não ionizante (UV) são eficazes na destruição de *S. aureus*, mas as enterotoxinas são resistentes aos tratamentos por irradiação aplicáveis a alimentos.

Para ocorrer DOA, induzidas por *S. aureus*, são necessárias determinadas características para o desenvolvimento da bactéria e produção de enterotoxinas entre as quais: a existência de uma fonte com *Staphylococcus* produtores de enterotoxinas, transferência

da bactéria para o alimento (através da manipulação ou mesmo por equipamentos contaminados devido à falta de boas práticas de higiene), composição dos alimentos favorável ao crescimento de *S. aureus*, temperatura e tempo suficiente para a produção e desenvolvimento de enterotoxinas e, por fim, ingestão de alimentos que contenham quantidades suficientes de toxina para provocar a intoxicação alimentar (16).

As enterotoxinas podem também causar síndrome do choque tóxico, que é uma condição grave de saúde, identificada por erupções cutâneas, choque hipovolêmico e síndrome do desconforto respiratório (5,7,18,30).

A enterotoxina estafilocócica A (SEA), isoladamente ou em conjunto com outras SEs, é a enterotoxina mais frequente em alimentos e também é considerada a principal causa de intoxicação alimentar por *S. aureus* (SFP), provavelmente devido à sua alta resistência a enzimas proteolíticas (28,30,37).

7.1 Nomenclatura

As SEs pertencem à família de superantígenos de toxinas pirogênicas (25,31), e a sua nomenclatura foi baseada na sua atividade emética ou na sua capacidade de ativar células T e ativar um sistema hiperinflamatório (37)

À parte das acima referidas, também existe a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), que também ativam o sistema hiperinflamatório, e não apresentam atividade emética (5,7,38,39,40,45). No entanto, esta toxina leva à libertação de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas e também células T e macrófagos (18).

A lista de SEs é composta por um número variado de moléculas e as suas variantes moleculares: as clássicas SEA, SEB, SEC (5,9,26,28,30,32,47) (com as variantes SEC1, SEC2 e SEC3, SEC ovina e SEC bovina) que têm uma elevada atividade emética, SED e SEE, que foram descobertas em estudos de culturas de *S. aureus* envolvidos em surtos de SFP e classificados em tipos sorológicos distintos. (9,23). A denominação de cada enterotoxina veio de acordo com a ordem de descoberta e por ordem alfabética como SEA e SEB (16,23,39) e os novos tipos de SEs (SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET) (9,31,35).

7.2 Fatores que afetam o desenvolvimento de enterotoxinas

A estabilidade térmica das enterotoxinas, é influenciada pelas características dos alimentos, como o pH, a presença de cloreto de sódio (NaCl) e também pelo tipo de toxina. (16) Por exemplo, SEA é mais estável termicamente e é mais ativa a pH neutros e ácidos do que a pH básico (16).

Em relação à atividade da água (a_w) é importante sublinhar que *S. aureus* se consegue desenvolver num amplo intervalo da atividade da água relativamente a outros patógenos que se desenvolvem em alimentos. Como se observa na tabela 1, esse intervalo corresponde a uma a_w mínima de 0,83-0,99 que corresponde a 0-20% NaCl, sendo que a condição ótima de desenvolvimento é cerca de 0,98. (16,40,44).

Em relação ao desenvolvimento de enterotoxinas, os valores variam de acordo com o tipo de toxina produzido. Relativamente a SEA e SED, estas toxinas desenvolvem-se em quase todas as condições de atividade de água, já as toxinas SEB e SEC, são sensíveis à redução da atividade de água, sendo dificultado o seu desenvolvimento com uma atividade da água a 0,93 (16,46).

A maioria das bactérias estafilocócicas consegue desenvolver-se em ambientes com pH entre os 4 e os 10, sendo ideal o pH entre 6 e 7. (tabela1) (16,26,40,45). Outros parâmetros afetam o crescimento de SE's nos alimentos, nomeadamente as condições aeróbicas e anaeróbicas em que em aerobiose *S. aureus* tolera pH mais baixos (pH=4) e em anaerobiose apenas tolera pH entre os 4,6 e os 5,3 (16).

S. aureus tem a capacidade de se desenvolver entre os 7°C e os 46°C, sendo que a temperatura ótima ronda os 37°C (tabela 1) (16,47). Para além disto, é resistente a ciclos de congelação/descongelação e tem a capacidade de sobreviver durante períodos alargados em alimentos armazenados a temperaturas inferiores a -20°C. A bactéria em si é destruída pela pasteurização, mas as enterotoxinas já formadas são resistentes aos processos térmicos (16,38).

Tabela 1. Fatores que afetam o crescimento e produção de enterotoxinas por *S. aureus* (Adaptado de Jacques, 2011) (16).

| Fator | Desenvolvimento de <i>S. aureus</i> | | Produção da Enterotoxina de <i>S. aureus</i> | |
|------------------------|-------------------------------------|--------------|--|------------|
| | Ótimo | Intervalo | Ótimo | Intervalo |
| Temperatura | 37 | 7-48°C | 37-45 | 10-45 |
| pH | 6-7 | 4-10 | 7-8 | 4-9.6 |
| Atividade da Água (AW) | 0.98 | 0.83 → 0.99* | 0.98 | 0.85→0.99* |
| NaCl | 0 | 0-20 | 0 | 0-10 |

*Aeróbio (anaeróbio 0.90→0.99)

**Aeróbio (anaeróbio 0.92→0.99)

Para além dos fatores referidos, existem fatores nutricionais também associados ao crescimento de *S. aureus*. Produtos ácidos, produção de peróxido de hidrogénio ou outras substâncias inibidoras, como antibióticos e compostos voláteis, funcionam como inibidores do crescimento de *S. aureus*. Neste contexto, a utilização de culturas *starter*, podem ser fulcrais na produção de alimentos fermentados, para prevenir o aparecimento da bactéria (16).

7.3 Modo de ação

Tem sido sugerido que SEs têm influência no nervo vago, que por sua vez transmite o sinal e estimula o centro de vômito no cérebro. Esta ideia é comprovada através dos recetores nos neurónios aferentes vagais, que são pontos chave para o desencadeamento da emese (37).

Além disso, as SEs são capazes de penetrar no revestimento intestinal e ativar respostas imunes locais e sistémicas (37). Ocorre então a libertação de mediadores inflamatórios (incluindo histamina, leucotrienos e substância peptídica neuroentérica P), causando assim o vômito e a resposta emética, que pode ser eliminada por bloqueadores dos canais de cálcio, que também bloqueiam a libertação de histamina (32).

A ativação do sistema imunológico local, pode causar dano gastrointestinal associado à ingestão de SE (33). As alterações inflamatórias são observadas em várias regiões do trato gastrointestinal, mas as lesões mais graves aparecem no estômago no duodeno (32).

A diarreia associada à intoxicação por SEs pode ser causada pela inibição da reabsorção de água e eletrólitos no intestino delgado (32).

Não é necessária uma concentração elevada de toxina, para que haja doença e consequentes sintomas (28).

7.4 Detecção de enterotoxinas

Para a detecção de enterotoxinas, existem métodos tradicionais, em que o mais comum é o isolamento e contagem em que após serem enriquecidas em cloreto de sódio, as enterotoxinas são inoculadas numa placa em meio de ágar Baird-Parker ou numa placa de sangue e em seguida sofrem uma coloração Gram e exame microscópico de teste de coagulase (21,24).

Existe ainda o método de disco de papel que se baseia na reação de enzimas produzidas pelo metabolismo de *S. aureus* com substratos cromogénicos correspondentes, é uma técnica rápida, que apresenta alta sensibilidade e de utilização simples, mas tem um custo elevado (41).

Para além destes, existem métodos de detecção rápidos em que os mais utilizados são os testes de imunodifusão, os procedimentos ELISA e os testes PCR. (5,16,27,29,41). Os testes de imunodifusão, baseiam-se na combinação de um antígeno e um anticorpo, e então há a identificação da presença da bactéria através deste princípio. É um método mais rápido e sensível para enterotoxinas clássicas como SEA e SEB (17,38).

Os procedimentos ELISA, consistem em imunoensaios polivalentes ligados a enzimas (26). Trata-se de um método específico e sensível que, no entanto, também pode ser sujeito a erros devido a fatores externos podendo levar ao aparecimento de falsos positivos (16,17,36). Outra desvantagem deste método é necessitar de profissionais altamente treinados, portanto não é um método que pode ser utilizado no local (27).

Este método pode identificar diretamente as enterotoxinas, por isso é adequado para testes qualitativos. (17,28,36). Comparativamente a este procedimento existe outro, denominado EFLA (16,27,38), cujos resultados são expressos de acordo com a

intensidade de fluorescência obtida. É um método mais intuitivo do que ELISA, é altamente sensível e reduz o limite da detecção, no entanto pode apresentar erros, uma vez que as toxinas podem ficar inativas aquando o processamento alimentar (40).

Os ensaios baseados em PCR, são altamente utilizados, uma vez que são técnicas simples, rápidas e altamente sensíveis e específicas para a detecção de culturas enterogénicas. (5,17,38). Esta tecnologia também apresenta desvantagens pois, tem que extrair DNA e quando usado para detetar bactérias, não consegue distinguir os microrganismos vivos ou mortos, o que pode ser uma consequência para aparecerem falsos-positivos (16,41).

Outro método menos conhecido é a amplificação isotérmica mediada por Loop (LAMP), é uma tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos, rápida e de alta sensibilidade, no entanto pode apresentar falsos-positivos se a experiência não for feita em condições restritas (38).

Há também o método da sonda de ácido nucleico, que deteta microrganismos com base no princípio do emparelhamento de bases complementares, portanto amplifica as bactérias alvo projetando *primers* específicos baseados em sequências de ácidos nucleicos altamente conservadas. É um método altamente específico, preciso e sensível (39).

A separação magnética é um método caro e propenso a reações cruzadas, portanto, precisa de assistência na detecção por outros métodos técnicos, e pode ser utilizado no isolamento e detecção de *S. aureus* (41).

Os ensaios monovalentes são específicos para a SEA e SEE e podem ser usados para distinguir estes dois tipos (28).

Os métodos requerem que se retire uma parte de enterotoxina de alimentos suspeitos antes da análise, e que quanto maior a concentração de diálise dos alimentos, mais sensível e seletivo os métodos se tornam (28).

8. MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina)

A prevalência de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) na Europa, varia entre menos de 3% nos países nórdicos e Holanda e mais de 50% nos países de sul da Europa e Reino Unido (8).

O aparecimento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), é considerado uma grande ameaça para a saúde humana porque são mais difíceis de tratar com eficácia e eficiência, uma vez que têm resistência a uma ampla gama de antibióticos (27,43), como a meticilina, glicopeptídeos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (39). Para além disto, as infeções por MRSA, estão associadas a um aumento do tempo de internamento bem como dos custos associados (8,45). De 25% a 50% destas infeções ocorrem em ambiente hospitalar (8). Ademais, as doenças infecciosas que são causadas por MRSA, estão entre as principais causas de morte causada por agentes infecciosos (45).

A resistência a antibióticos como a meticilina, e também a outros antibióticos beta-lactâmicos, pode ser devido ao seu uso terapêutico extensivo ou mesmo à sua utilização como fator de crescimento, tanto na produção de alimentos como na produção animal (7) e também está associada à presença do gene *mecA*, que codifica uma proteína que se liga à penicilina (PBP2a) com baixa afinidade para β -lactâmicos (7,8,26,44,45) e a outros fatores como o gene *fem* (*factors essential for methicillin resistance*), devido à presença de um domínio transmembranar que possui um sítio alostérico (7,8). Como tal, todas colónias de bactérias que sejam produtoras de PBP2a, são resistentes aos β -lactâmicos (7).

Os MRSA, são denominados de acordo com a sua fonte epidemiológica, incluindo a sua estirpe relacionada com a saúde (HA-MRSA) cujo aparecimento está historicamente associado a hospitais e unidades de saúde (45), a estirpe associada com a comunidade (CA-MRSA) e também relacionadas com a pecuária (LA-MRSA) (29,46). No contexto de saúde pública, LA-MRSA representa um problema, não só para as pessoas que praticam pecuária, por causa da zoonose, mas também para as pessoas que vão interagir na cadeia alimentar com o animal/carne, seja por causa do manuseamento inadequado ou até mesmo pela contaminação cruzada que pode ocorrer durante o processamento (45,46).

Comparado com os restantes, CA-MRSA, é o menos resistente a antibióticos, como tal pacientes infetados com esta estirpe, podem ser tratados com aminoglicosídeos,

eritromicina, clindamicina e fluoroquinolonas, no entanto pode ser potencialmente infeccioso, causando infecções graves de pele e tecidos moles, bem como pneumonias necrosantes e fascite. No entanto pacientes que se encontrem gravemente doentes, por causa de HA-MRSA, necessitam de antibióticos ativos contra as bactérias infetantes (8).

A taxa de prevalência nosocomial de MRSA em Portugal representou uma das mais altas da Europa, atingindo aproximadamente 54,3%. Os clones de MRSA altamente disseminados responsáveis pela maioria das infecções por HA-MRSA em Portugal incluem o clone Nova Iorque/Japão (ST5-II), o clone Ibérico (ST247-I) e clone português (variante ST239-III). Destes, o clone ibérico e o clone Português foram os clones HA-MRSA mais proeminentes no início de 1990. Em 2018, o mais prevalente foi o clone Nova Iorque/Japão (8).

A genotipagem, tornou-se significativa para a identificação de MRSA e a avaliação genética é também importante para que haja um diagnóstico epidemiológico correto quando há diferentes fontes de contaminação. Entre os métodos de genotipagem existem a tipagem de sequência multilocus (MLST) bem como o polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), em que ambos produzem resultados semelhantes (8,29). Também existe uma técnica de Multiplex PCR que se baseia na deteção de genes *fem* e *mec* (26).

Para identificar MRSA, pode-se ainda utilizar métodos de tipagem, como eletroforese em gel de campo pulso (PFGE), que é uma técnica baseada na digestão de DNA bacteriano com endonucleases, gerando fragmentos que não poderiam ser identificados com eletroforese convencional, no entanto com PFGE a orientação do campo elétrico é pulsado permitindo uma mudança de direção do movimento do DNA permitindo a identificação dos fragmentos. A tipagem *SCCmec* é um método que permite identificar os clones de MRSA, através da identificação e amplificação do gene *SCCmec* que por sua vez é determinante para a resistência a antibióticos. Ainda na identificação de MRSA, existe a tipagem *spa* que se utiliza para ampliar e identificar a proteína A encontrada na parede celular de *S. aureus*, e que é codificada pelo gene *spa* (8).

Até aos dias de hoje, foi descoberta uma variação exuberante na prevalência de MRSA, dependendo do local geográfico em questão, que está relacionado com as características climáticas do local e com a falta de padronização na higiene dos alimentos (47).

Os alimentos são um componente essencial para a transferência de resistência a antimicrobianos. Essa transferência pode ocorrer pela existência de resíduos de antimicrobiano nos alimentos, através da transferência de microrganismos resistentes de origem alimentar, através do consumo de biofilme resistente da microflora alimentar ou mesmo através da transferência de resistência para microrganismos patógenos (16).

Podemos encontrar MRSA em alimentos de origem animal como carne de bovino, carne de frango e carne suína, também podem estar incluídos o leite de vaca e o queijo. (16,44,46). Durante o abate, se a carne estiver contaminada, poderá haver a contaminação dos manipuladores e do ambiente (16). Os MRSA merecem um diagnóstico separado de *S. aureus* devido à sua epidemiologia diversa nomeadamente morbidade e mortalidade e por este motivo representar um perigo para a saúde pública (27,47).

Para combater este agente bacteriano, pode-se utilizar a lisina do fago. A lisina é, do ponto de vista fisiológico, semelhante à lisozima, que é um antimicrobiano eucarionte. A lisina produzida pelo fago é uma hidrolase que pode lisar o peptidoglicano da parede celular bacteriana, sendo que é uma boa opção no tratamento antibacteriano, sem causar resistência. Isto acontece porque a lisina é constituída por dois módulos funcionais, o domínio de ligação à parede celular que é usado para reconhecer e se ligar às paredes celulares, e o domínio catalítico que divide as diferentes ligações do peptidoglicano. (42)

Outro meio de tratamento é a utilização de nisina, que apesar de ser um agente antimicrobiano, funciona de modo dependente da sua solubilidade aquosa e da sua estabilidade e do pH e para além desta desvantagem acrescenta-se o facto da sua atividade poder ser alterada por causa das enzimas proteolíticas (42).

9. Tratamento

Em aspetos tradicionais o domínio da intoxicação alimentar passa pelo controle das enterotoxinas ou mesmo pelo controle da propagação da bactéria (37).

A utilização de antimicrobianos não é recomendada, porque estes podem potenciar o choque devido à libertação de toxinas após a morte da bactéria e também, uma vez que tornam a flora intestinal mais sensível, facilitarem a colonização do trato gastrointestinal

e, conseqüentemente, aumentar a replicação de estafilococos resistentes a antimicrobianos, permitindo que secretem mais toxinas (37,47).

No caso é recomendada a elevada ingestão de líquidos para a recuperação de eletrólitos que são perdidos devido à ocorrência de vômitos e diarreia intensos (43,50).

Os antibióticos da família dos β -lactâmicos, são por norma a primeira escolha no tratamento de infecções por *S. aureus*, no entanto, devido à resistência adquirida, começou-se a dar preferência às vancomicinas, no entanto estes apresentavam uma enorme suscetibilidade. Como tal, foram criados como cefalosporinas, glicopeptídeos (incluindo vancomicina), lipoglicopeptídeos, lipopéptidos, oxazolidinonas e medicamentos mais recentes, como tedazolida e radezolida. Para prevenir a resistência, utiliza-se combinação de antibióticos para assim aumentar a atividade bactericida (48).

9.1 Vacinas e Anticorpos Monoclonais:

O sucesso das vacinas contra *S. aureus*, foi posto em causa devido a dois aspetos de patogénese, o primeiro é que *S. aureus* é uma bactéria facultativa intracelular e o segundo é que consegue evitar o sistema imunitário (37,48).

A produção de vacinas para potenciar a imunidade humoral, poderia ser um método vantajoso, para reduzir a agressividade de infecções causadas por *S. aureus*, através da anulação de fatores de virulência, moléculas de evasão e também de fatores de superfície, potenciando a sua destruição (5).

Já a produção de anticorpos contra proteínas produzidas por estafilococos, pode trazer proteção contra a sépsis nos pacientes, bem como contra toxinas produzidas pelas bactérias, mas apesar disto, como *S. aureus* produz um número elevado de toxinas, torna-se necessário uma terapia combinatória contra enterotoxinas (37).

9.2 Componentes naturais contra infecções contra *Staphylococcus sp*:

As estratégias para o tratamento com compostos naturais podem ser classificadas como terapias antimicrobianas e terapias antivirulência, em que as primeiras servem para inibir o crescimento bacteriano, e as segundas para inibir os fatores de virulência bacterianos (37).

Outro objetivo da utilização de compostos naturais combinados com antibióticos é o aumento da atividade antibacteriana dos antibióticos. Como tal, podemos considerar 3 mecanismos de ação quando o ajuntamento desta dupla: ação multialvo, onde cada composto atua em locais diferentes das células bacterianas, propriedades farmacocinéticas e físico-químicas, como por exemplo o aumento da solubilidade e biodisponibilidade de antibióticos, e finalmente, a objetivando para um mecanismo de resistência bacteriana (49).

Como referido anteriormente, *S. aureus* produz um número elevado de toxinas, para adicionar a esta característica, apresenta fatores de virulência e resistência antimicrobiana, resistência essa que é aumentada pela produção de biofilme e isto faz com que *S. aureus* seja uma das principais causas de DOA. No entanto já existe evidência da utilização de compostos naturais na prevenção contra o crescimento e desenvolvimento bacteriano, nomeadamente polifenóis e flavonóides, que combinados com outros compostos antimicrobianos atuam diretamente contra enterotoxinas, inibindo a sua produção ou até mesmo o seu mecanismo de ação, para além de que conseguem inibir o desenvolvimento de biofilme (18,38,49).

Os ácidos orgânicos naturalmente presentes em frutas e vegetais, como o ácido cítrico, pode ajudar no combate bacteriano, através da quelação de metais (25).

Outro exemplo de um composto natural antibacteriano que combate a infeção por *S. aureus* é a tomatidina, que é um alcalóide que pode alterar a expressão de muitos genes dos fatores de virulência podendo alterá-los. Além destes compostos estudos revelam que o ácido gálico, ácido elágico, flavonóides (como o hidrato de morina, encontrado nas folhas de goiaba) e fenólicos, derivados fenólicos e alcalóides, ácidos gordos e organo-enxofres (aloe e vera, alho preto e eucalipto) também apresentam uma atividade antibacteriana importante contra *S. aureus* (18,37,49).

A anisodamina é um alcalóide produzido por uma erva chinesa que reduz a concentração de TSST-1, portanto diminui o risco de síndrome tóxica (37).

Para além disto, os compostos fenólicos, por exemplo os do azeite, podem ser utilizados no controle da secreção de alguns SEs e para ajudar a controlar a sua atividade hemolítica, estes podem diminuir a produção de SEA e SEB, e conseqüentemente a libertação de TNF-, que poderá por fim reduzir os seus efeitos adversos (37).

O flavonóide naringenina, presente em frutos cítricos, pode reduzir a expressão das toxinas produzidas por *S. aureus*, no entanto como apresenta baixa biodisponibilidade quando administrada via oral, é necessário o desenvolvimento de grupos lipofílicos e criar novas formas de naringenina-glicosiladas afim de melhorar a sua absorção (18,37).

Todos os acima referidos necessitam de mais estudos, pois não foram testados *in vivo* (37) com exceção do flavonóide naringenina, que foi testado em ensaios clínicos de estudos anteriores (36).

10. Prevenção

O aparecimento de DOA, podem estar relacionados com a preparação inadequada dos alimentos, bem como o armazenamento e confeção incorretos, podendo então ocorrer contaminação cruzada. Para além destas causas, a má higienização de equipamentos e utensílios de cozinha também pode ser uma causa crucial de contaminação cruzada (50).

Ter o conhecimento sobre os fatores que afetam o crescimento bacteriano num alimento bem como na formação de virulência, não só irá permitir uma prevenção adequada, como também permitirá fazer uma avaliação de riscos microbiana quantitativa (QMRA). Uma avaliação de riscos consiste em quatro etapas: identificação do perigo, descrição do perigo, avaliação da exposição e identificação do risco (30).

Como tal, a utilização de métodos de análise de risco e uma aproximação preventiva, como por exemplo a Análise de Perigos e Controle de Pontos Críticos (HACCP), bem como o compromisso dos produtores de alimentos com as boas práticas de higienização e desinfecção, poderá ser a metodologia principal de prevenção (30,47).

As DOA também são evitáveis, se houver uma especial atenção à contaminação tanto em casa como numa cozinha de restauração. É importante cozinhar bem os alimentos, mas também é necessário evitar a contaminação cruzada, através de por exemplo evitar a utilização dos mesmos utensílios de manipulação de alimentos crus para manipular alimentos cozinhados (29).

Portanto, a prevenção da intoxicação alimentar por *S. aureus* deve cumprir e ter em atenção três requisitos:

- Manutenção de um padrão de higiene elevado;
- Cuidados no manuseamento de alimentos;
- Controlo regular e diário de temperatura. (38,53).

Em relação às temperaturas, deve manter-se os alimentos quentes a mais de 65°C e alimentos que requerem refrigeração a 4°C ou menos (53).

Os alimentos que já foram cozinhados, a não ser que sejam imediatamente servidos devem ser refrigerados e servidos até no máximo duas horas (53).

Deve-se ainda utilizar temperaturas de confecção e arrefecimento seguras, e para haver esta garantia, deve-se utilizar termómetros de alimentos para fazer as medições de temperaturas e efetuar o seu registo (53).

No caso de MRSA, além da aplicação de medidas de boas práticas de higiene e desinfecção, bem como de controle, é necessário a vigilância do ponto de vista de criação de gado, para assim controlar a prevalência de MRSA nos animais (47).

Como os microrganismos capazes de contaminar alimentos e de os degradar podem aderir a superfícies, como é o caso de *S. aureus*, é necessário manter um padrão de higiene referente a equipamentos e utensílios desde a produção até ao consumo do alimento, desde a sua correta lavagem e desinfecção, como a sua correta secagem pois a humidade associada à presença de água, pode estar associada ao favorecimento de propagação de microrganismos. (16,31).

Para além de cuidados com os alimentos, também existem cuidados de higiene pessoal e no manuseamento de alimentos a ter em consideração entre os quais: lavagem de mãos regular, deve durar no mínimo 20 segundos, utilização de luvas no manuseamento de alimentos caso exista cortes ou infeções e também não manusear os alimentos caso tenha diarreia ou vómitos (36,48,53).

11. Probióticos e *Staphylococcus aureus*

Os probióticos são descritos como microrganismos vivos simbiotes, residentes no intestino humano, que consumidas em quantidades adequadas e suficientes podem promover a saúde humana e proteção contra várias doenças (51).

As espécies de bactérias mais utilizadas para a formulação de probióticos são *Lactobacillus*, *Escherichia* e *Enterococcus*. O primeiro, inclui estirpes que produzem lactato e ácido láctico como produtos finais (4).

Os mecanismos dos probióticos são variados e neles estão incluídos: produção de ácidos orgânicos para baixar o pH intestinal e aumentar os movimentos peristálticos bem como a diminuição da biodisponibilidade de nutrientes para haver a inibição do crescimento de microrganismos, função imunomoduladora do sistema imune do hospedeiro e também inibição de toxinas bacterianas (51,52).

Além dos acima referidos, os mecanismos de ação dos probióticos sobre o intestino humano também se baseiam na produção de bacteriocinas e peróxido de hidrogénio que são substâncias inibitórias, que inibem a proliferação de bactérias patogénicas de Gram positivo e inibem a adesão das bactérias de Gram-negativo (13).

Estudos propõem que as proteases produzidas pelas bactérias lácticas (LAB), ajudam a diminuir os níveis de SEA, ou que tornam associada à célula (tornando-a indetetável), pelo que dá para concluir que estas bactérias, podem diminuir a concentração de enterotoxina (30).

Outro estudo demonstrou o efeito do probiótico *Bacillus*, na prevenção da colonização de *S. aureus*, uma vez que tem a vantagem de dispensar a terapia com antibióticos, que são gravemente problemáticos para outro tipo de infeções e também não eliminam determinados seres patogénicos. (53).

O mecanismo primário deste microrganismo é a inibição de *quorum sensing* que é um mecanismo para controlo de diversos processos (como a densidade microbiana e produção de biofilme e também o controle de alterações da fisiologia celular), através da produção de fengicinas, que são lipopéptidos e contém uma atividade antifúngica que por sua vez inibe a formação de biofilme de *S. aureus* (13,19,48,54,55). Esta atividade é explicada uma vez que as fengicinas vão competir com os AIPs (peptídeos autoindutores de Agr) devido à sua estrutura semelhante, pelo domínio extracelular AgrC, impedindo a transdução do sinal de Agr por inibição competitiva como análogos estruturais de AIPs (54).

Outra vantagem do uso deste probiótico seria a produção eficaz de substâncias ativas que o manteriam presente na mucosa intestinal, mas apesar disto, este seria um probiótico que teria de ser administrado regularmente por não ser um colonizador permanente no intestino humano. Para além destes fatores, *Bacillus* é considerado seguro e com outros benefícios de probióticos como imunomodelação, apesar desta ainda precisar de mais estudos (18).

Há um número limitado de estudos que relacionam os probióticos e a inibição de *S. aureus* e MRSA. Vários estudos comprovaram efeitos benéficos de *Lactobacillus rhamnosus* na redução da morte celular de queratinócitos, induzida por *S. aureus*. causada pelo efeito antagónico entre a produção de ácido láctico e a proliferação destas bactérias (14,17).

No entanto, os probióticos podem potencializar inibição da formação de biofilme de MRSA, por competição e produção de ácidos ou mesmo por produção de inibidores de bacteriocina (13). Como por exemplo, foi demonstrado a eliminação de quase todas as células de MRSA através da utilização de um probiótico comercial denominado de Bio-K+R (50).

No entanto no caso de MRSA, o probiótico demonstrou ser mais eficaz, mas apenas quando introduzido ao mesmo tempo que a infecção por *S. aureus* (14,17).

Apesar destes avanços significativos, a influencia da utilização de probióticos na inibição de *S. aureus* e MRSA ainda se demonstra controversia, pelo que são necessários mais estudos (54).

12. Conclusões

S. aureus está associado a umas das principais causas de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, e, portanto, é considerado um problema de saúde pública, que pode causar doenças comunitárias e hospitalares.

Clinicamente, um fator que se deve ter em conta em relação a *S. aureus*, é a sua capacidade de adquirir resistência a antibióticos o que inevitavelmente irá complicar o tratamento. Do ponto de vista histórico, esta resistência foi adquirida depois do aparecimento da penicilina. A questão major associada às infecções por MRSA, é o aumento do tempo de internamento, bem como aumentos dos custos associados à saúde.

Para minimizar e prevenir os surtos de intoxicações alimentares por *S. aureus* e MRSA, é necessário um conjunto procedimentos para evitar a contaminação cruzada e proliferação de microrganismos, como por exemplo, a aplicação de normas de boas práticas de higiene, a aplicação de pontos de controle e a avaliação de riscos, e devem ser aplicados em toda a cadeia alimentar, ou seja, desde a produção primária até ao prato do consumidor.

Essas regras práticas são altamente eficazes e incluem a cobertura de feridas ou cortes das mãos dos trabalhadores, a lavagem e desinfecção frequentes das mãos, o uso de luvas e sua troca regular, a exclusão de trabalhadores com doenças contagiosas por manipulação

de alimentos e, acima de tudo, a educação continuada e supervisão de pessoal nas práticas de higiene.

Para além de medidas de higiene pessoal, também existem medidas diretas para os alimentos, nomeadamente o respeito pelas temperaturas de armazenamento e confeção, bem como a sua desinfeção e lavagem correta. Também devemos considerar a utilização de utensílios diferentes para alimentos crus ou cozinhados.

É importante manter um plano de monitoramento e vigilância, não para tratamento e controle, mas sim para determinar estratégias de controle e monitorizar a sua eficácia.

Há uma crescente valorização do papel da microbiota intestinal no crescimento e adesão de patógenos e como tal, na sua prevenção.

Os probióticos conferem inúmeras vantagens para a microbiota intestinal e para a promoção de saúde humana, no entanto cada vez se pensa mais que a utilização de probióticos poderá ser utilizada na prevenção e tratamento de doenças causadas por microrganismos, podendo funcionar como inibidores da sua ação ou como redutores da sua biodisponibilidade. No entanto mais estudos são necessários uma vez que os resultados ainda são controversos.

13. Bibliografia

1. Israel LFS, Rabello RF, Domingos SCB, Medeiros LS. Produção de biofilme por *Staphylococcus chromogenes* isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos com mastite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2018 Dec;70(6):1943–9.
2. Chen Q, Xie S, Lou X, Cheng S, Liu X, Zheng W, et al. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. *Microbiologyopen*. 2020 Jan 25;9(1).
3. Maia DSV, Haubert L, Kroning IS, Soares K dos S, Oliveira TL, da Silva WP. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food poisoning outbreaks and effect of *Butia odorata* Barb. *Rodr. Extract* on planktonic and biofilm cells. *LWT*. 2020 Jan;117:108685.
4. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:107.
5. G. Abril A, G. Villa T, Barros-Velázquez J, Cañas B, Sánchez-Pérez A, Calomata P, et al. *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. *Toxins (Basel)*. 2020 Aug 20;12(9):537.
6. Bencardino D, Vitali LA. *Staphylococcus aureus* carriage among food handlers in a pasta company: pattern of virulence and resistance to linezolid. *Food Control*. 2019 Feb;96:351–6.
7. Ortega E, Abriouel H, Lucas R, Gálvez A. Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. *Toxins (Basel)*. 2010 Aug 10;2(8):2117–31.
8. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018 Oct;31(4).
9. Puah S, Chua K, Tan J. Virulence Factors and Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolates in Ready-to-Eat Foods: Detection of *S. aureus* Contamination and a High Prevalence of Virulence Genes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2016 Feb 5;13(2):199.
10. Denayer S, Delbrassinne L, Nia Y, Botteldoorn N. Food-Borne Outbreak Investigation and Molecular Typing: High Diversity of *Staphylococcus aureus* Strains and Importance of Toxin Detection. *Toxins (Basel)*. 2017 Dec 20;9(12):407.
11. Sikorska H, Smoragiewicz W. Role of probiotics in the prevention and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2013 Dec;42(6):475–81.

12. Rocha-Ramírez LM, Pérez-Solano RA, Castañón-Alonso SL, Moreno Guerrero SS, Ramírez Pacheco A, García Garibay M, et al. Probiotic *Lactobacillus* Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. *Journal of Immunology Research*. 2017;2017:1–14.
13. Silva DR, Sardi J de CO, Pitangui N de S, Roque SM, Silva ACB da, Rosalen PL. Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions. *Journal of Functional Foods*. 2020 Oct;73:104080.
14. Eggers S, Barker A, Valentine S, Hess T, Duster M, Safdar N. Impact of Probiotics for Reducing Infections in Veterans (IMPROVE): Study protocol for a double-blind, randomized controlled trial to reduce carriage of *Staphylococcus aureus*. *Contemporary Clinical Trials*. 2017 Jan;52:39–45.
15. Schelin J, Wallin-Carlquist N, Thorup Cohn M, Lindqvist R, Barker GC. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*. 2011 Nov 27;2(6):580–92.
16. Hennekinne JA, de Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012 Jul;36(4):815–36.
17. Fox EM, Jiang Y, Tinoco MB. *Staphylococcus aureus* - Dairy. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier; 2022. p. 522–9.
18. Kim MK. *Staphylococcus aureus* Toxins: From Their Pathogenic Roles to Anti-virulence Therapy Using Natural Products. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2019 Jun 4;24(3):424–35.
19. Steven Y. C. Tong a JSD a EE b TLH b VGFJr b, c. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *cmr.asm*. 2015 Jul;28:1–59.
20. Rodrigo Boscariorl JDOGCP. PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. *Revista saúde em Fogo*. 2018;11–6.
21. Alarjani KM, Skalicky M. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* and its in-vitro potential inhibition efficiency. *Journal of Infection and Public Health*. 2021 Dec;14(12):1796–801.
22. Hannah McCarthy1 JustineKRNikkiSBLE and JamesPO. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2015 Jan;5:1–9.
23. Katrin Schilcher a ARH b. *Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2020 Aug 12;84(3):1–36.
24. Otto M. *Staphylococcal Biofilms*. *Microbiology Spectrum*. 2018 Jul 27;6(4).
25. Akbas MY, Kokumer T. The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid

- treatments. International Journal of Food Science & Technology. 2015 Jul;50(7):1666–72.
26. Bhattacharya M, Wozniak DJ, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. Expert Review of Anti-infective Therapy. 2015 Dec 2;13(12):1499–516.
 27. Rubab M, Shahbaz HM, Olaimat AN, Oh DH. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. Biosensors and Bioelectronics. 2018 May;105:49–57.
 28. Elaine Ibrahim de Freitas. Detecção de Gnes de enterotoxinas de *staphylococcus* spp. isolados de queijo minas frescal. Rio de Janeiro; 2005. p. 1–119.
 29. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. BioMed Research International. 2014;2014:1–9.
 30. Oliveira AG de M de, Melo L, Gomes DBC, Peixoto RS, Leite DC de A, Leite SGF, et al. Condições higiênico-sanitárias e perfil da comunidade microbiana de utensílios e mesas higienizadas de um serviço de alimentação localizado no Rio de Janeiro. Brazilian Journal of Food Technology. 2019;22.
 31. Schelin J, Wallin-Carlquist N, Thorup Cohn M, Lindqvist R, Barker GC. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. Virulence. 2011 Nov 27;2(6):580–92.
 32. Sandra M. Tallent RWB and JMH. BAM Chapter 13B - Staphylococcal Enterotoxins Detection Methods. U.S Food & Drugs . 2018.
 33. Johler S, Giannini P, Jermini M, Hummerjohann J, Baumgartner A, Stephan R. Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by egc-Encoded Enterotoxins. Toxins (Basel). 2015 Mar 20;7(3):997–1004.
 34. Sihto HM, Tasara T, Stephan R, Johler S. Validation of reference genes for normalization of qPCR mRNA expression levels in *Staphylococcus aureus* exposed to osmotic and lactic acid stress conditions encountered during food production and preservation. FEMS Microbiology Letters. 2014 Jul;356(1):134–40.
 35. Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. Toxins (Basel). 2010 Jul 5;2(7):1751–73.
 36. Jenny Schelin 1, * Nina Wallin-Carlquist, 1 Marianne Thorup Cohn, 2 Roland Lindqvist, 3 Gary C. Barker4 and Peter Rådström1. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. Landes Bioscience. 2011;1–13.
 37. Zhang X, Hu X, Rao X. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* toxins. Microbiological Research. 2017 Dec;205:19–24.

38. Mourenza Á, Gil JA, Mateos LM, Letek M. Novel Treatments and Preventative Strategies Against Food-Poisoning Caused by Staphylococcal Species. *Pathogens*. 2021 Jan 20;10(2):91.
39. Attien P, Sina H, Moussaoui W, Zimmermann-Meisse G, Dadié T, Keller D, et al. Mass Spectrometry and Multiplex Antigen Assays to Assess Microbial Quality and Toxin Production of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical and Food Samples. *BioMed Research International*. 2014;2014:1–8.
40. Park JY, Seo KS. *Staphylococcus aureus*. In: *Food Microbiology*. Washington, DC, USA: ASM Press; 2019. p. 555–84.
41. Escola Superior de Biotecnologia Universidade Católica. *Staphylococcus aureus*. Autoridade de Segurança Alimentar e económica.
42. Zhao Y, Xia D, Ma P, Gao X, Kang W, Wei J. Advances in the detection of virulence genes of *Staphylococcus aureus* originate from food. *Food Science and Human Wellness*. 2020 Mar;9(1):40–4.
43. Yan J, Yang R, Yu S, Zhao W. The strategy of biopreservation of meat product against MRSA using lytic domain of lysin from *Staphylococcus aureus* bacteriophage. *Food Bioscience*. 2021 Jun;41:100967.
44. Ali GH, Seiffein NL. Association of some virulence genes in Methicillin resistant and Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* infections isolated in community with special emphasis on *pvl/mecA* genes profiles in Alexandria, Egypt. *Gene Reports*. 2021 Dec;25:101334.
45. da Silva AC, Rodrigues MX, Silva NCC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food and the prevalence in Brazil: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2020 Mar 30;51(1):347–56.
46. Tomao P, Pirolo M, Agnoletti F, Pantosti A, Battisti A, di Martino G, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from dairy farms in North-eastern Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 2020 Nov;332:108817.
47. D. Sergelidis¹ and A.S. Angelidis². Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a controversial food-borne pathogen. *Letters in Applied Microbiology*. 2017 Mar 11;1–10.
48. Dayan GH, Mohamed N, Scully IL, Cooper D, Begier E, Eiden J, et al. *Staphylococcus aureus* : the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. *Expert Review of Vaccines*. 2016 Nov 9;15(11):1373–92.
49. Mikłasińska-Majdanik M, Kępa M, Wojtyczka R, Idzik D, Wąsik T. Phenolic Compounds Diminish Antibiotic Resistance of *Staphylococcus Aureus* Clinical Strains. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018 Oct 22;15(10):2321.

50. Sabrina Bartz ECT. Evaluation of two recommended disinfection methods for cleaning cloths used in food services of southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012 Nov;1–6.
51. Mahsa Abbasi¹ | Samaneh Dolatabadi² | Ghazaleh Ghorbannezhad¹ | Fatemeh Shari³ | Hamid Reza Rahimi⁴. The role of probiotics in inhibition mechanism of methicillin-resistant staphylococcus aureus. *McGill Journal of Medicine*. 2020 Jun 30;1–11.
52. Piewngam P, Zheng Y, Nguyen TH, Dickey SW, Joo HS, Villaruz AE, et al. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. *Nature*. 2018 Oct 10;562(7728):532–7.
53. Piewngam P, Otto M. Probiotics to prevent *Staphylococcus aureus* disease? *Gut Microbes*. 2020 Jan 2;11(1):94–101.
54. York A. Silencing *Staphylococcus aureus* with probiotics. *Nature Reviews Microbiology*. 2018 Dec 16;16(12):715–715.
55. Prince T, McBain AJ, O’Neill CA. *Lactobacillus reuteri* Protects Epidermal Keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-Induced Cell Death by Competitive Exclusion. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012 Aug;78(15):5119–26.