

Atividade antagonista do leite fermentado por *kefir* contra *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA)

Alice Bento¹, Ketlyn Oliveira¹, Margarida Vasques¹, Edna Ribeiro²

1. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal.
2. H&TRC – Health & Technology Research Center, ESTeSL – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal. edna.ribeiro@estesl.ipl.pt

RESUMO: A crescente resistência microbiana aos antibióticos é considerada uma das maiores ameaças à saúde pública a nível mundial e promove uma necessidade urgente de desenvolvimento de novas opções terapêuticas. O probiótico *kefir* tem vindo a ser apontado como um potencial agente antimicrobiano contra bactérias com capacidade de aquisição de multirresistências como *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) é definido como prioridade de saúde pública, associado a infeções da comunidade e nosocomiais com elevadas taxas de mortalidade. Este estudo tem como objetivo avaliar a capacidade antagonista do probiótico *kefir* contra MRSA. Neste estudo foram utilizadas três variantes biológicas de grãos de *kefir* para testar a suscetibilidade de MRSA segundo os métodos de *spot-on-lawn* para avaliação de inibição de crescimento e de diluição para contagem estimada de UFC/mL. O leite fermentado por *kefir* após 24 horas de fermentação foi utilizado de forma integral, isto é, sem extração dos seus componentes. A análise de resultados obtidos demonstrou que a capacidade de inibição do MRSA pelo leite fermentado por *kefir* é dependente da dose e das variantes biológicas dos grãos. Estes resultados apontam o *kefir* como um potencial agente natural possível de ser utilizado como adjuvante para fins terapêuticos ou de descolonização contra o MRSA.

Palavras-chave: Probióticos; *Kefir*; Antagonismo; MRSA; Resistência; Suscetibilidade; Saúde pública

Antagonistic activity of kefir fermented milk against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

ABSTRACT: Antibiotic resistance escalation is considered to be one of the greatest public health threats worldwide and has enhanced an urge for the implementation of new antimicrobial agents. The probiotic *Kefir* has been identified as a potential antimicrobial agent against bacteria with a tendency to acquire multidrug resistance, such as *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* resistant to methicillin (MRSA) is classified as a public health priority, associated with community and nosocomial infections with high mortality rates. The objective of this study is to evaluate the antagonistic capacity of the probiotic *kefir* against MRSA. In this study, three samples of *kefir* grains from three different households were used, in which MRSA susceptibility was tested by the *spot-on-lawn* to evaluate inhibition and dilution methods for CFU/mL estimation. The 24-hour *kefir* fermented milk was used in its whole, that is, without extraction of its components. The analysis of the results obtained showed that the inhibition of MRSA by *kefir*-fermented milk is dependent on the dose and biological variations of the grains. Overall, our results suggest that the probiotic *kefir* should be considered as a potential natural agent that may be used for therapeutic adjuvant or decolonization purposes against MRSA.

Keywords: Probiotics; *Kefir*; Antagonism; MRSA; Resistance; Susceptibility; Public health.

Introdução

Os antibióticos β -lactâmicos, pertencentes à classe de antibióticos mais numerosa e mais utilizada em antibioterapia, atuam em enzimas designados por proteínas ligantes de

penicilina (PBP, *penicillin-binding proteins*)¹. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) são o exemplo mais importante de aquisição de uma nova PBP. A resistência das estirpes de *Staphylococcus aureus* aos β -lactâmicos ocorre devido à aquisição do gene *mecA*, que codifica uma PBP

divergente das proteínas endógenas, designada de PBP2a ou PBP2' sem sensibilidade para os antibióticos β -lactâmicos^{1,2}.

MRSA é definido como prioridade de saúde pública na Europa, sendo Portugal um dos países com maior prevalência deste micro-organismo resistente³.

Atualmente os rastreios de indivíduos colonizados com MRSA são realizados e limitados apenas a amostras de exsudados nasais com vista à sua descolonização com mupirocina⁴; no entanto, investigações recentes comprovam que existe uma percentagem significativa de pacientes com colonização extranasal⁵⁻⁷ e que a colonização intestinal pode facilitar a transmissão do micro-organismo⁸. Portadores extranasais de MRSA são também uma fonte de contaminação e transmissão significativa⁹⁻¹¹.

É importante exaltar que a deficiência no controlo e prevenção de infeções contribui para acelerar o processo de resistências aos antibióticos. Desta forma, devem ser tomadas as medidas necessárias para limitar a propagação de micro-organismos com genes de resistência associados¹². As terapias de descolonização têm surgido como possíveis medidas de controlo e prevenção; no entanto, devem ser tomadas considerando as indicações, vantagens e limitações deste procedimento. Dentre os motivos que levam à não recomendação da descolonização encontram-se a possibilidade de favorecimento da ocorrência de resistência aos antibióticos¹³.

Estudos sobre o impacto de antibióticos orais na descolonização intestinal de *S. aureus* evidenciam que o risco de bactérias resistentes emergentes é extremamente elevado e apontam para a importância de se explorar o potencial de descolonização de opções alternativas aos antibióticos convencionais que envolvam agentes naturais, como os probióticos, destacando a necessidade de se encontrar a melhor opção para a descolonização intestinal¹⁴.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando ministrados de forma adequada, conferem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro¹⁵. O *kefir* é um alimento funcional e um probiótico composto por leite fermentado por uma mistura de bactérias dos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Acetobacter*, produtoras de ácido láctico, de ácido acético e leveduras (e.g., *Candida*, *Saccharomyces*, *Brettanomyces* e *Kluyveromyces*), que sintetizam um polissacarídeo designado de *kefiran* e se agregam em grãos constituídos por uma matriz complexa de proteínas e hidratos de carbono, com consistência elástica e gelatinosa, rico em cálcio, proteínas e vitaminas, e é constituído por compostos bioativos, aos quais têm sido atribuídos diversos efeitos benéficos para a saúde¹⁶. Existe uma relação de simbiose entre o conjunto de micro-organismos responsável pela fermentação, que é evidenciada em diversos estudos pela ausência de crescimento no leite ou decréscimo na atividade bioquímica quando estas estirpes são separadas em culturas puras¹⁶⁻¹⁷.

A atividade antagonista *in vitro* do *kefir* tem sido demonstrada em diversos estudos com avaliação da ação dos grãos de *kefir*¹⁸⁻¹⁹, da totalidade de estirpes do leite fermentado por *kefir*^{2,4}, de estirpes isoladas²¹⁻²² e de proteínas extraídas deste composto¹⁹, contra diversas bactérias patogénicas, incluindo *Staphylococcus aureus*, o principal agente de infeções noso-

comiais e adquiridas na comunidade, com percentagens elevadas de estirpes resistentes a diversos antibióticos, antisépticos e desinfetantes^{17,23-24}.

Este estudo tem como objetivo avaliar o potencial antagonista do leite fermentado por *kefir* contra MRSA, considerando a utilização do leite fermentado na sua totalidade de forma a maximizar a aproximação à realidade dos consumidores. Perspetiva-se que os resultados possam comprovar o potencial do *kefir* como alternativa terapêutica e de descolonização, bem como para a prevenção de colonização.

Métodos

Amostras microbiológicas

Foram selecionadas de forma não aleatória por conveniência três amostras de grãos de *kefir* de origem não comercial, provenientes de locais distintos, de maneira a garantir variabilidade biológica, passando estas a ser denominadas como *kefir A*, *kefir B* e *kefir C*.

A estirpe de MRSA utilizada como objeto de estudo foi adquirida a um laboratório de referência, devidamente certificado, pertencendo ao programa de controlo de qualidade externo UK NEQAS²⁵.

Preparação do kefir

Os grãos de *kefir* (30 gramas) foram submetidos a seis ciclos de fermentação de 24 horas à temperatura ambiente em 150mL leite meio gordo. As três amostras de *kefir* foram tratadas separadamente. Terminado o período de fermentação, os grãos de *kefir* foram separados do leite fermentado com recurso a um passador metálico, sendo o leite fermentado armazenado.

Preparação da suspensão bacteriana

Foi preparada uma suspensão bacteriana de MRSA em soro fisiológico estéril à escala 1 de *McFarland* com aproximadamente 3×10^8 UFC/mL, correspondendo a uma absorvância de 0,257 a um comprimento de onda de 600nm. Foi realizado um controlo da suspensão bacteriana em gelose de sangue.

Método spot-on-lawn

A suspensão bacteriana de MRSA foi semeada por distensão em placas de BHI Agar, sendo posteriormente adicionados 20 μ L de leite fermentado por *kefir* na superfície do meio. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. Após o período de incubação, a zona de contacto com o leite fermentado por *kefir* foi analisada, tendo sido classificada como presença ou ausência de inibição. O procedimento foi realizado em triplicado.

Método de diluição

Foram inoculados 100 μ L da suspensão bacteriana de MRSA em tubos de ensaio contendo concentrações crescentes (2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5 e 5,5mL) de leite fermentado por *kefir* e de meio BHI *infusion* (8, 7,5, 7, 6,5, 6, 5,5, 5 e 4,5mL), perfa-

zendo cada tubo um volume total de 10mL. Todos os tubos de ensaio foram homogeneizados no vórtex e incubados durante 24 horas a 37 °C.

Após incubação foram realizadas passagens de 10µL de cada tubo de ensaio para placas de gelose de sangue através de sementeira por esgotamento. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C, período após o qual foi estimado o número de unidades formadoras de colónias (UFC) para cada placa. Como teste confirmatório foi efetuado o teste de aglutinação em látex Slidex Staph Kit (Biomerieux ref #73115).

De modo a assegurar que o efeito antagonista não se deve ao leite utilizado na fermentação do *kefir* foi efetuado um controlo contendo 2mL de leite, 8mL de BHI *infusion* e um controlo com 5,5mL de leite, 4,5mL de BHI *infusion* e 100µL da suspensão bacteriana de MRSA. Adicionalmente foi realizado um controlo do meio de cultura BHI *infusion*, de modo a garantir a esterilidade do mesmo.

Considerações éticas

Este estudo cumpre as normas vigentes da Comissão de Ética da ESTeSL, não apresentando quaisquer obstáculos ético-legais.

Resultados

Leite fermentado por *kefir* induz inibição de crescimento de MRSA

Os resultados obtidos através da aplicação do método *spot-on-lawn* demonstraram o efeito de inibição de crescimento do MRSA na zona de contacto com o leite fermentado por *kefir* (cf. Figura 1).



Figura 1. Zona de inibição de crescimento indicado por seta, de MRSA induzida pelo leite fermentado por *kefir* após 24 horas.

A diminuição de UFC/mL de MRSA por leite fermentado por *kefir* é dependente da concentração

O efeito de diferentes concentrações de leite fermentado por *kefir* nas UFC/mL de MRSA foi determinado através do método de diluição. Para as contagens de UFC foi efetuada a

contagem de UFC/10µL para os duplicados de cada uma das concentrações e calculada a média dos duplicados, sendo este valor convertido em UFC/mL.

Relativamente aos resultados observados após exposição ao leite fermentado por *kefir*, as contagens de UFC/mL das várias concentrações testadas apresentam valores entre $13,4 \times 10^3$ e $1,65 \times 10^3$ UFC/mL. Os resultados obtidos demonstram que o efeito inibitório do leite fermentado por *kefir* é dependente do volume, o que é demonstrado pela diminuição das contagens de UFC/mL de MRSA (cf. Figura 2).

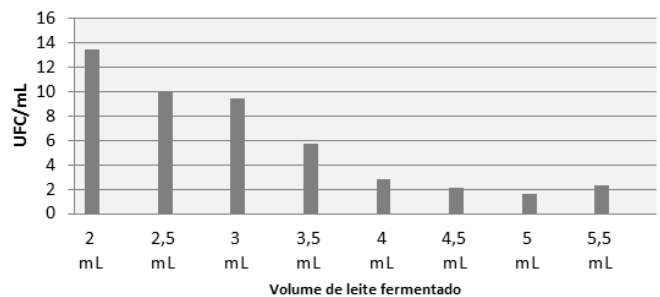


Figura 2. Representação gráfica das UFC/mL de MRSA das várias concentrações avaliadas de leite fermentado por *kefir*.

A variabilidade biológica do *kefir* afeta o antagonismo induzido a MRSA

De modo a avaliar o potencial efeito da variabilidade biológica dos grãos comerciais de *kefir* no seu efeito antagonista relativamente ao MRSA, foram avaliadas e comparadas três amostras comerciais de *kefir* para a maior concentração utilizada (5,5mL) anteriormente. Os resultados obtidos demonstraram que o leite fermentado pelos grãos comerciais de *kefir* C apresentou um efeito antagonista mais acentuado que o leite fermentado pelo *kefir* A (variante biológica utilizada neste estudo anteriormente) e que o leite fermentado pelo *kefir* B, (cf. Figura 3). A descrição macroscópica do leite fermen-

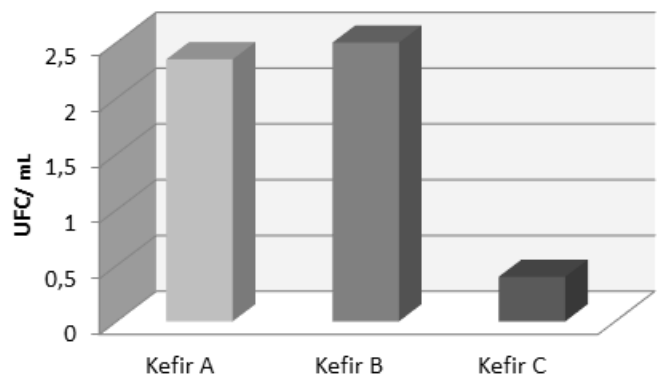


Figura 3. Representação gráfica das UFC/mL para as concentrações de 5,5mL de cada amostra de variantes biológicas comerciais *kefir*.

tado pelo *kefir* C revelou que este apresenta uma consistência mais densa que os restantes. O leite fermentado pelos *kefir* A e B apresentava uma consistência semelhante entre si, o que é concordante com os resultados semelhantes obtidos.

Leite não fermentado por *kefir* não afeta o crescimento e UFC/mL de MRSA

De modo a avaliar o efeito do leite sem fermentação por *kefir* no crescimento de MRSA foram avaliadas as UFC resultantes da exposição de 2mL e 5,5mL deste. Os resultados obtidos demonstraram que ambos apresentaram crescimento de colónias, cujo resultado foi incontável (> 300 UFC)²⁸ (cf. Figura 4).

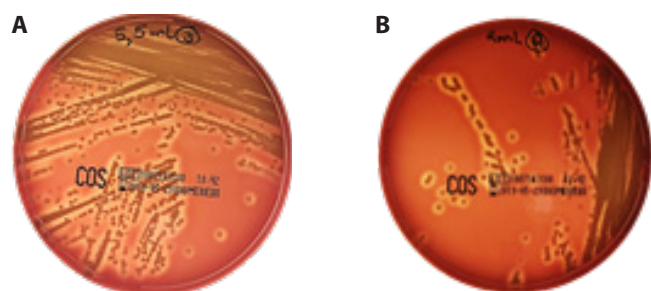


Figura 4. Resultado incontável de colónias com morfologia e beta-hemólise características do *S. aureus* para 100µL de suspensão bacteriana de MRSA e uma concentração de: (A) 5,5mL de leite, 4,5mL de meio BHI *infusion*; (B) 2mL de leite, 8mL de meio BHI *infusion*.

Discussão

Atualmente a resistência aos antibióticos de bactérias patogénicas, como o caso do MRSA, constitui um desafio mundial com impacto na saúde humana, relacionado quer com infeções clínicas quer com colonização humana e animal³. Deste modo, novas estratégias terapêuticas devem ser estudadas e avaliadas.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam o efeito antagonista notório do leite fermentado pelo probiótico *kefir*, um alimento funcional constituído por compostos bioativos, associados a efeitos benéficos para a saúde¹⁶ contra estirpes de MRSA.

Os dados apresentados neste estudo corroboram resultados de estudos anteriores como o trabalho publicado por Kumar *et al.*, o qual demonstrou através da utilização da metodologia *spot-on-lawn* que a bactéria *L. plantarum* KF, isolada a partir de *kefir*, apresenta uma zona de inibição de crescimento de MRSA de $23,3 \pm 1,5$ mm²¹. O estudo conclui que bactérias produtoras de ácido láctico isolado de produtos, como o *kefir*, podem ser utilizadas enquanto potencial agente anti-MRSA, com baixo potencial de incremento de multirresistência a antibióticos²¹.

Por outro lado, um estudo de 2005 determinou uma concentração mínima inibitória e uma concentração bactericida mínima de 462 e 494mg/L, respetivamente, para *S. aureus*

suscetível à metilina (MSSA), através do método de diluição, concluindo que os biofilmes do *kefir* e seus compostos polisacáridos poderão ser agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios e cicatrizantes¹⁹.

É também importante considerar que o processo de fermentação do *kefir* é amplamente influenciado pelas estirpes presentes, que são, por sua vez, influenciadas por diversos fatores que incluem as condições de manuseamento e armazenamento dos grãos^{16,20}. Estudos realizados anteriormente por Kim *et al.*²⁰, Anderson e Gilliland²⁶ e Pintado *et al.*²⁷ sugerem que diferentes variantes biológicas de *kefir* apresentam espectros antimicrobianos distintos, o que é concordante com os resultados obtidos, uma vez que o *kefir* C apresentou maior poder inibitório que os restantes. De acordo com estudos publicados anteriormente, o efeito antagonista induzido pelo leite fermentado por *kefir* contra estirpes de MRSA poderá estar associado à inibição direta por efeito combinado de ácido acético, ácido láctico e peróxido de hidrogénio, produção de bacteriocinas e por competição por nutrientes e locais de ligação¹⁷.

Tanto quanto se sabe, este trabalho apresenta o primeiro estudo desenvolvido em que é feita a avaliação do efeito do leite fermentado (sem extração de componentes) por *kefir* no fenótipo de resistência do MRSA, o que se aproxima à decorrente exposição efetiva humana a este probiótico.

Conclusões

O presente estudo demonstra que o *kefir* apresenta efeito antagonista contra o MRSA e que, por este motivo, poderá ser ponderada a sua utilização como terapêutica coadjuvante e/ou como base de novos estudos que pretendem avaliar novas abordagens terapêuticas contra a resistência microbiana a antibióticos.

Apoio financeiro

Os autores agradecem o apoio institucional dado pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. Este trabalho não obteve financiamento externo.

Referências bibliográficas

1. Fernandes R, Amador P, Prudêncio C. Beta-lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev Med Microbiol.* 2013;24(1):7-17.
2. Fuda C, Suvorov M, Vakulenko SB, Mobashery S. The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 2004;279(39):40802-6.
3. Direção-Geral da Saúde. Programa de prevenção e controlo de infeções e de resistência aos antimicrobianos [homepage]. Lisboa: DGS; 2019. Available from: <https://www.dgs.pt/programa-de-prevencao-e-controlo-de-infecoes-e-de-resistencia-aos-antimicrobianos/eventos/dia-mundial-da-higiene-das-maos/2019.aspx>
4. Direção-Geral da Saúde. Prevenção e controlo de colonização e infeção por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) nos hospitais e unidades de inter-

- namento de cuidados continuados integrados: norma n.º 018/2014, de 09/12/2014, atualizada em 27/04/2015. Lisboa: DGS; 2015.
5. Claassen-Weitz S, Shittu AO, Ngwarai MR, Thabane L, Nicol MP, Kaba M. Fecal carriage of *Staphylococcus aureus* in the hospital and community setting: a systematic review. *Front Microbiol.* 2016;7:449.
 6. McKinnell JA, Huang SS, Eells SJ, Cui E, Miller LG. Quantifying the impact of extranasal testing of body sites for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at the time of hospital or intensive care unit admission. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34(2):161-70.
 7. Rimland D, Roberson B. Gastrointestinal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1986;24(1):137-8.
 8. Bhalla A, Aron DC, Donskey CJ. *Staphylococcus aureus* intestinal colonization is associated with increased frequency of *S. aureus* on skin of hospitalized patients. *BMC Infect Dis.* 2007;7:105.
 9. Acton DS, Plat-Sinnige MJ, Van Warnel W, De Groot N, Van Belkum A. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(2):115-27.
 10. Gravet A, Rondeau M, Harf-Monteil C, Grunenberger F, Monteil H, Scheftel JM, et al. Predominant *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-associated diarrhea is clinically relevant and produces enterotoxin A and the bicomponent toxin LukE-LukD. *J Clin Microbiol.* 1999;37(12):4012-9.
 11. Boyce JM, Havill NL, Maria B. Frequency and possible infection control implications of gastrointestinal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):5992-5.
 12. Nair R, Perencevich EN, Blevins AE, Goto M, Nelson RE, Schweizer ML. Clinical effectiveness of mupirocin for preventing *Staphylococcus aureus* infections in nonsurgical settings: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2016;62(5):618-30.
 13. Oliveira AC, Paula AO. Descolonização de portadores de *Staphylococcus aureus*: indicações, vantagens e limitações [Decolonization of *Staphylococcus aureus* carriers: indications, advantages and limitations]. *Texto Context Enferm.* 2012;21(2):448-57. Portuguese
 14. Gagnaire J, Verhoeven PO, Grattard F, Rigail J, Lucht F, Pozzetto B, et al. Epidemiology and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* intestinal carriage: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017;15(8):767-85.
 15. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11(8):506-14.
 16. Farnworth ER, Mainville I. Kefir: a fermented milk product. In: Farnworth ER. *Handbook of fermented functional foods.* 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis; 2008. p. 89-128. ISBN 9781420053265
 17. Rosa DD, Dias MM, Grześkowiak ŁM, Reis SA, Conceição LL, Peluzio MC. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev.* 2017;30(1):82-96.
 18. Kivanc M, Yapici E. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during the fermentation and storage of kefir. *Food Sci Technol.* 2019;39 Suppl 1:225-30.
 19. Rodrigues KL, Caputo LR, Carvalho JC, Evangelista J, Schneedorf JM. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25(5):404-8.
 20. Kim DH, Jeong D, Kim H, Kang IB, Chon JW, Song KY, et al. Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 2016;36(6):787-90.
 21. Kumar LM, Saad WZ, Mohamad R, Rahim RA. Influence of biofilm-forming lactic acid bacteria against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA S547). *Asian Pac J Trop Biomed.* 2017;7(12):1107-15.
 22. Shokryazdan P, Sieo CC, Kalavathy R, Liang JB, Alitheen NB, Jahromi MF, et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *Biomed Res Int.* 2014;2014:927268.
 23. Foster T. *Staphylococcus*. In: Baron S, editor. *Medical microbiology* [Internet]. 4th ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. chapter 12. ISBN 0963117211. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/
 24. Huseini HF, Rahimzadeh G, Fazeli MR, Mehrazma M, Salehi M. Evaluation of wound healing activities of kefir products. *Burns.* 2012;38(5):719-23.
 25. Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental EPE. Acreditação e certificação [homepage]. Lisboa: CHLO EPE [cited 2019 Jun 1]. Available from: www.chlo.min-saude.pt/index.php/centrohospitalar/acreditacao-ecertificacao#
 26. Anderson JW, Gilliland SE. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Nutr.* 1999;18(1):43-50.
 27. Pintado ME, Lopes-da-Silva JA, Fernandes PB, Malcata FX, Hogg TA. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. *Int J Food Sci Technol.* 1996;31(1):15-26.

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter quaisquer conflitos de interesse.

Artigo recebido em 15.01.2020 e aprovado em 17.03.2020