

## ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS MEDIOS SELECTIVOS PARA LA RECUPERACIÓN DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* EN EMBARAZADAS

Marina Quiroga, Oscar Álvarez, Eduardo Pegels, Patricia Oviedo, Esteban Pereyra, Marta Vergara.

### COMPARATIVE STUDY OF TWO SELECTIVE MEDIA IN THE RECOVERY OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* IN PREGNANT WOMEN

#### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the performance of two selective media in the recovery of *Streptococcus agalactiae* (GBS) isolated from anorectum and vaginal introitus swabs of pregnant women between 35 and 37 weeks gestation.

The swabs were cultured in selective Todd Hewitt broth containing colistin (10 µg/ml) and nalidixic acid (15 µg/ml) (TH-CoNa) and Todd Hewitt broth containing colistin (10 µg/ml) and gentamicin (8 µg/ml) (TH-GeNa), following conventional methods.

A total of 16 (5.88%) strains of GBS were isolated from 272 patients. Of those, 16/16 (100%) were recovered on TH-CoNa and only 2/16 (12.5%) on TH-GeNa.

Based on these findings, TH-GeNa should not be considered an acceptable alternative to TH-CoNa for the detection of GBS colonization in pregnant women.

**KEY WORDS:** *Streptococcus agalactiae*, selective media, pregnant women.

#### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el comportamiento de dos medios selectivos en la recuperación de *Streptococcus agalactiae* (SGB) de hisopados anorectales e introito vaginales obtenidos de embarazadas entre la 35 a 37 semanas de gestación.

Los hisopados fueron cultivados según métodos convencionales en caldo selectivo Todd Hewitt conteniendo colistina (10 µg/ml) y ácido nalidixico (15 µg/ml) (TH-CoNa) y caldo selectivo Todd Hewitt conteniendo colistina (10 µg/ml) y gentamicina (8 µg/ml) (TH-GeNa).

Dieciséis (5,88%) cepas de SGB fueron aisladas de 272 pacientes. El 16/16 (100%) de las cepas fueron recuperadas de TH-CoNa, y solo el 2/16 (12,5%) de TH-GeNa.

Basado en estos hallazgos, el TH-GeNa no debería ser considerado una alternativa aceptable para detectar la colonización por SGB en mujeres embarazadas.

**PALABRAS CLAVE:** *Streptococcus agalactiae*, medios selectivos, embarazadas.

## INTRODUCCIÓN

*Streptococcus agalactiae* emerge como patógeno neonatal en los años 70 y desde entonces representa la causa principal de infección bacteriana del recién nacido en países desarrollados [1].

SGB forma parte de la flora normal del tracto gastrointestinal desde donde en forma intermitente puede colonizar el área perianal y la vagina [2]. Esta colonización del tracto genital es un hecho importante, en especial en las gestantes, por la posibilidad de transmisión al recién nacido [2].

Este microorganismo es el principal agente etiológico de la sepsis neonatal precoz y está implicado en la producción de complicaciones obstétricas como la ruptura prematura de membrana, parto pretérmino, corioamnionitis, endometritis, infección de herida quirúrgica postcesárea,

infección urinaria, sepsis puerperal, entre otras [1, 2, 3, 4]. La infección precoz se asocia en un 90% de los casos con la colonización materna por SGB, con factores de riesgo perinatales y con la ausencia de anticuerpos contra el mismo [2, 5].

Debido a la importancia de SGB como patógeno en neonatos y gestantes, desde 1996 se recomendó realizar cultivos de tamizaje (screening) en las embarazadas entre las semanas 35–37 de gestación, tanto de la región vaginal como ano rectal y el uso de medios de cultivo adecuados. El uso de medios selectivos mejora la recuperación de SGB de muestras provenientes del tracto vaginal y ano rectal, al inhibir la flora acompañante [5].

Sin las medidas de prevención, el 50% de los recién nacidos de madres portadoras de SGB son colonizados al momento del nacimiento, desarrollando el 1–2% una infección

clínica en las primeras horas de vida o aun después de los 7 días posteriores. Las infecciones clínicas como neumonías, sepsis o meningitis se presentan en un 25% de los nacidos pretérmino con una mortalidad cercana al 10%. La mitad de los recién nacidos que sobreviven desarrollan secuelas como alteraciones visuales, auditivas e incluso mentales [1, 2, 6]. Con la aplicación de las medidas de prevención, la incidencia de esta infección y la mortalidad asociada se han reducido sensiblemente [2].

La tasa de colonización para SGB en gestantes presenta variaciones según el área geográfica [2, 5, 7]. Diversos autores [3, 6, 8, 9] postulan que estas diferencias dependen no solo de la población en estudio (grupo étnico, edad, área geográfica, etc.) sino también de los medios y técnicas de cultivo utilizados y de las áreas anatómicas de las que se toma la muestra.

Entre los medios de cultivo selectivos recomendados para el procesamiento de muestras genito-rectales de mujeres embarazadas se encuentran el caldo Todd Hewitt suplementado con colistina (10 µg/ml) y ácido nalidixico (15 µg/ml) (TH-CoNa) y el caldo Todd Hewitt suplementado con gentamicina (8 µg/ml) y ácido nalidixico (15 µg/ml) (TH-GeNa) [10].

En el año 2005, un laboratorio nacional (Laboratorios Britania) inició el desarrollo de estos medios de cultivos selectivos para su posterior comercialización, solicitando su ensayo a la Cátedra de Bacteriología de la FCEQyN, entre otros grupos, con el fin de evaluar el rendimiento de los mismos.

A partir de dicha solicitud, se establecieron como objetivos de este trabajo, comparar la sensibilidad para la recuperación del SGB de los dos medios de cultivo selectivos experimentales, TH-CoNa y TH-GeNa, a partir de muestras provenientes de gestantes entre 35 y 37 semanas de gestación y a partir de cepas salvajes que forman parte de la colección de la Cátedra de Bacteriología.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Estudio a partir de muestras clínicas

Desde junio del 2005 a marzo del 2006 se estudiaron 272 muestras de mujeres embarazadas, entre las 35–37 semanas de gestación que concurrían a sus controles obstétricos en el Hospital Ramón Madariaga, Periférico 17 y Policlínico Víctor Reck de Posadas, Hospital de área de Aristóbulo del Valle y Hogar Belén de Garupá.

Se obtuvieron hisopados del introito vaginal (sin utilización de espéculo) y ano rectal. Los hisopos obtenidos se colocaron en medio de transporte Cary Blair hasta su procesamiento en el laboratorio de la Cátedra de Bacteriología de la FCEQyN.

Las muestras se sembraron en caldo Todd Hewitt suplementado con colistina (10 µg/ml) y ácido nalidixico (15 µg/ml) (TH-CoNa) y paralelamente en caldo Todd Hewitt suplementado con gentamicina (8 µg/ml) y ácido nalidixico

(15 µg/ml) (TH-GeNa).

Luego de 18 a 24 horas incubación a 37°C en aerobiosis, los caldos se transfirieron a placas de agar base Columbia suplementado con 5% de sangre humana (AS) con posterior incubación en microaerofilia a 37°C por 24 horas.

Las colonias beta o gamma hemolíticas compatibles con SGB se identificaron mediante pruebas bioquímicas convencionales: catalasa, pirrolidonil-amino-peptidasa, bilis esculina, hidrólisis de hipurato y prueba de CAMP. La confirmación serológica de los aislamientos se realizó mediante técnicas de aglutinación con partículas de látex (Phadebact *Streptococcus* test).

### Estudio cuantitativo de cepas de colección

Se procedió a estudiar 22 cepas de SGB seleccionadas al azar, y conservadas en agar blando (caldo nutritivo más 7/000 de agar-agar).

A fin de corroborar su pureza y viabilidad, las cepas se recuperaron en placas de AS, las que se incubaron durante 24 hs a 37°C en microaerofilia.

A partir de cultivos de 24 horas se realizaron suspensiones, hasta alcanzar una concentración equivalente al 0,5 de Mac Farland, en caldo TH-CoNa y TH-GeNa de cada una de las cepas a estudiar. Los caldos se incubaron en estufa a 37°C en aerobiosis durante 24 horas.

Posteriormente se realizó una dilución 1/10000 y se procedió a la siembra de 3 µl de cada uno de los caldos en placas de AS, con una incubación posterior en microaerofilia a 37°C por 24 horas.

## RESULTADOS

En 16 de las 272 muestras de hisopados genito-rectales se detectó SGB.

El medio TH-CoNa permitió la recuperación de 16/16 (100%) de los aislamientos, mientras que en el medio TH-GeNa solo se recuperaron 2/16 (12,5%) de los mismos.

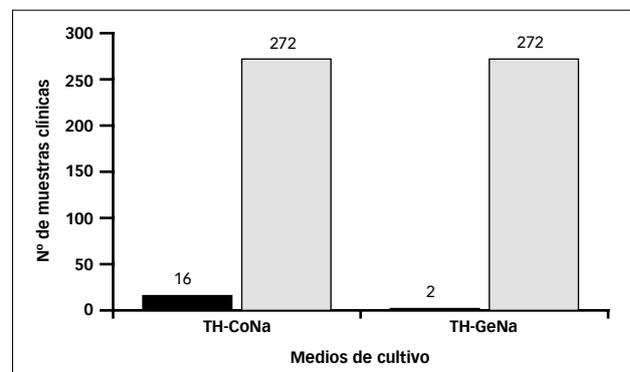


FIGURA 1. Frecuencia de aislamiento de *Streptococcus agalactiae* según medio de cultivo utilizado.

Referencias: TH-CoNa: caldo Todd Hewitt suplementado con colistina (10 µg/ml) y ácido nalidixico (15 µg/ml), TH-GeNa: caldo Todd Hewitt suplementado con gentamicina (8 µg/ml) y ácido nalidixico (15 µg/ml), ■ Muestras positivas, □ Total de muestras clínicas.

Por lo que, con el medio TH-CoNa la frecuencia de colonización detectada fue del 5,88%, mientras que no superó el 0,74% en el medio TH-GeNa. (Figura 1).

Todas las cepas de colección de SGB sembradas en el medio TH-CoNa desarrollaron en AS con recuentos entre  $10^7$ – $10^9$  UFC/ml (datos no mostrados), no así en el medio TH-GeNa, a partir del cual ninguna de las cepas mostraron desarrollo en AS.

## DISCUSIÓN

La importancia de la pesquisa de SGB en mujeres embarazadas radica en la posibilidad de prevenir la infección del recién nacido. Su reconocimiento permite la instauración de la profilaxis intraparto (PIP) y de este modo interrumpir la transmisión vertical reduciendo su incidencia (6).

Los estudios de prevalencia de SGB en embarazadas muestran tasas variables de portación, dependiendo de la población estudiada, la ubicación geográfica, la región anatómica de obtención de la muestra (vaginal y/o anal) y el medio de cultivo utilizado (selectivo o no selectivo) [3].

Se han propuesto varios medios de cultivo selectivos para la identificación de SGB, mostrando cada uno distintos rendimientos según el área geográfica en donde se realizó su búsqueda [2, 3, 5, 6]. En ellos se agregan diferentes mezclas antibióticas con el objetivo de inhibir la flora acompañante presente en las muestras genito-rectales, siendo los antibióticos más utilizados gentamicina, colistina, ampicacina y ácido nalidíxico, entre otros.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el TH-CoNa es el que mejor se comporta como medio selectivo para la recuperación de SGB de muestras genito-rectales. Esta mejora en la detección de SGB permitiría administrar la PIP a un 87,5% más de gestantes que no se hubieran considerado portadoras de SGB de emplearse el medio TH-GeNa.

Si bien en trabajos realizados en España [11] y Chile [3] se propone la utilización del TH-GeNa como el medio de cultivo selectivo indicado para la recuperación del SGB, estudios realizados por autores de nuestro país [6] sugieren que la concentración de gentamicina (8 µg/ml) sería inhibitoria para muchas cepas de SGB.

La controversia respecto al uso de gentamicina en medios selectivos para la recuperación de SGB ya ha sido previamente planteada [12, 13, 14, 15, 16]. Nuestros resultados soportan la posición de Gray y colaboradores [12], quienes basados en estudios realizados con gran cantidad de cepas, claramente contraindican el uso de gentamicina en medios selectivos de enriquecimiento para la recuperación de SGB.

El análisis realizado a partir de las cepas de colección también mostró una marcada diferencia entre los dos medios de cultivo utilizados, sugiriendo que el número de organismos presentes en las muestras genito-rectales no

sería un efecto limitante para la recuperación de SGB, sino que la recuperación estaría relacionada con la sensibilidad de cada cepa a los antimicrobianos contenidos en el medio de cultivo. Estos resultados coinciden con lo observado en diversos estudios [17, 18, 19], donde SGB muestra diferencias en la sensibilidad a gentamicina en distintas poblaciones.

## CONCLUSIÓN

Nuestro estudio muestra que en nuestra área geográfica, el caldo TH-CoNa es el medio de cultivo selectivo con mejor rendimiento para la recuperación de SGB a partir de muestras genito-rectales de embarazadas y que dicho rendimiento no estaría relacionado con el número de organismos presentes en las muestras, sino con la sensibilidad de cada cepa a los antimicrobianos contenidos en el medio de cultivo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 1. de Cueto, M; de la Rosa, M.

Prevención de la infección neonatal por *Streptococcus agalactiae*. Un tema consolidado. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21(4):171–173, 2003.

2. Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología (SEGO). Sociedad Española de Neonatología (SEN). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Sociedad Española de Quimioterapia (SEQ). Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria (SEMFYC). Prevención de la infección perinatal por *Streptococcus* del grupo B. Recomendaciones españolas revisadas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21(8):417–423, 2003.

### 3. Valdés, E.; Pastene, C.; Morales, A.; Gutiérrez, B.;

Canales, A.; Martínez, P.; Juárez, G.; Caballero, R.

Prevalencia de colonización por *Streptococcus agalactiae* (Grupo B) durante el embarazo pesquisado en medio de cultivo selectivo. *Rev Chil Obstet Ginecol* 69(2): 132–135, 2004.

### 4. Hernáiz, C.; Antón, N.; Alós, J.; Orden, B.; Orellana, M.;

Colombina, J.; Redondo, J. y Gómez-Garcés, J.

Significado clínico del aislamiento de *Streptococcus agalactiae* de orina de pacientes de centros de salud. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22(2): 89–91, 2004.

### 5. Crespo Ortiz, M.; Vélez, J.

Importancia clínica del *Streptococcus agalactiae* como causante de infección. *Colombia Médica* 27:53–58, 1996.

### 6. García, S.; Cora, Eliseth M.; Lazzo, M.; Copolillo, E.;

Barata, A.; de Torres, R.; Vay, C.; Famiglietti, A.

Portación de estreptococo grupo B en mujeres embarazadas. *Rev. Arg. Microbiol.* 35:183–187, 2003.

**7. Abarzúa, F.; Zajer, C.; Guzmán, A. M.; Beldar, C.; Beker, J.; Rioseco, O.; Oyarzún, E.**

Determinación de la portación de *Streptococcus agalactiae* (Grupo B) en embarazadas durante el tercer trimestre mediante inmunoensayo. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.* 67(4): 293–295, 2002.

**8. Nizet, V.; Craig, R.**

Factores de virulencia de Streptococcus grupo B con importancia en infecciones neonatales. Asociación Argentina de Microbiología, Boletín N° 14. Enero, 2000.

**9. Hansen, S. M.; Sorensen, U. B.**

Method for quantitative detection and presumptive identification of group B streptococci on primary plating *J Clin Microbiol.* 41(4): 1399–1403, 2003.

**10. Centers for Disease Control and Prevention.** Prevention of perinatal group B streptococcal disease. A public health perspective. *MMWR* 45: 1–24, 1996.

**11. Bosch, J.; Murillo, S.; Rico, M.; Salgado, M.**

Utilidad de un medio selectivo disco–caldo para la detección de *Streptococcus* del grupo B en la vagina. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 16(2): 83–84, 1998.

**12. Gray, B. M.; Pass, M. A.; Dillon, H. C. Jr.**

Laboratory and field evaluation of selective media for isolation of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 9 (4): 466–470, 1979.

**13. Dunne, W. M.; Holland–Staley, C. A.**

Comparison of NNA agar culture and selective broth culture for detection of group B streptococcal colonization in women. *J. Clin. Microbiol.* 36 (8): 2298–2300, 1998.

**14. Fenton, L. J.; Harper, M. H.**

Evaluation of colistin and nalidixic acid in Todd–Hewitt broth for selective isolation of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 9 (2): 167–169, 1979.

**15. Persson, K. M.; Forsgren, A.**

Antimicrobial susceptibility of group B streptococci. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5 (2): 165–166, 1986.

**16. Persson, K. M.; Forsgren, A.**

Evaluation of culture methods for isolation of group B streptococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 6 (2): 175–177, 1987.

**17. González, J. J.; Andreu, A.**

Grupo de Estudio de Infección Perinatal. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Sensibilidad a antimicrobianos del *Streptococcus* del grupo B de transmisión vertical. Estudio multicéntrico. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22 (5): 286–291, 2004.

**18. Betriu, C.; Gómez, M.; Sánchez, A.; Cruceyra, A.;**

**Romero, J.; Picazo, J. J.**

Antibiotic resistance and penicillin tolerance in clinical isolates of group B streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother* 38 (9): 2183–2186, 1994.

**19. Berkowitz, K.; Regan, J. A.; Greenberg, E.**

Antibiotic resistance patterns of group B streptococci in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* 28 (1): 5–7, 1990.

Recibido: 30/08/06.

Aprobado: 14/12/07.

• Marina Quiroga<sup>1</sup>

Bioquímica; Especialista en Microbiología Clínica; Doctora de la Universidad de Buenos Aires, área Microbiología; Profesora Adjunta Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCE–QyN, UNaM; Categoría III Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.

(miquiroga@fceqyn.unam.edu.ar,

marinaquiroya@fceqyn.unam.edu.ar).

• Oscar Álvarez<sup>1</sup>

Bioquímico; Ayudante ad–honorem Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM.

• Eduardo Pegels<sup>1</sup>

Licenciado en Bioquímica; Especialista en Microbiología Clínica; Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM; Categoría III Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.

• Patricia Oviedo<sup>1</sup>

Bioquímica; Magíster en Gerenciamiento y Administración en Sistema de Salud; Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM; Categoría IV Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.

• Esteban Pereyra<sup>2</sup>

Médico; Especialista en Ginecología y Obstetricia; Jefe Sector de Internación Maternidad Hospital Dr. Ramón Madariaga, Posadas, Misiones.

• Marta Vergara<sup>1</sup>

Bioquímica; Master Internacional en Bacteriología y Micología; Especialista en Educación Superior; Profesora Titular Cátedra de Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN, UNaM; Categoría II Sistema de Incentivos Docentes–Investigadores.

1– Cátedra de Bacteriología. FCEQyN. Universidad Nacional de Misiones. Av. Mariano Moreno 1375 (3300). Posadas. Misiones. Argentina.

(bacterio@fceqyn.unam.edu.ar).

2– Servicio de Obstetricia. Hospital Dr. Ramón Madariaga. Av. López Torres 1177. (3300). Posadas. Misiones. Argentina.