

Influência do conteúdo vaginal de gestantes sobre a recuperação do estreptococo do grupo B nos meios de transporte Stuart e Amies

Influence of vaginal environment of pregnant women on the recovery of group B streptococcus in Stuart and Amies transport media

José Antonio Simões¹, Giana Balestro Poletti², Priscilla Mendes Portugal³, Eliane Melo Brolazo³, Michelle Garcia Discacciati³, Gabriela Daoud Crema⁴

RESUMO

Objetivo: avaliar a influência do meio vaginal de gestantes na sobrevivência do estreptococo do grupo B (EGB) mantido por 8, 24 e 48 horas nos meios de transporte Amies e Stuart. **Métodos:** foram coletados três *swabs* vaginais de 30 gestantes atendidas no Ambulatório de Pré-Natal do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O primeiro *swab* foi mergulhado diretamente no meio seletivo de Todd-Hewitt; o segundo foi utilizado para a realização da bacterioscopia corada pelo Gram e o terceiro foi mergulhado em 2 mL de solução salina à qual foram acrescentados 200 µL de uma suspensão contendo EGB na concentração de $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia. Desta última suspensão de EGB, foram colhidos três *swabs* do meio Amies e três do meio Stuart, os quais foram mantidos em temperatura ambiente por 8, 24 e 48 horas, para posterior semeadura em ágar sangue. A leitura do crescimento das placas foi realizada após 24 horas de incubação e classificada semiquantitativamente (0-3 cruzes) de acordo com o número de colônias observadas. A análise estatística foi efetuada com o teste exato de Fisher. **Resultados:** a recuperação do EGB nos meios de transporte Amies e Stuart após 48 horas de estocagem foi de 97 e 87%, respectivamente. Em um dos quatro casos em que não houve a recuperação do EGB após 48 horas de armazenamento, o pH vaginal foi superior a 4,5 e em dois casos havia a presença de vaginose citolítica. **Conclusões:** ambos os meios de transporte mostraram-se adequados para a recuperação do EGB em gestantes até 48 horas após a coleta. As características do meio vaginal não influenciaram a recuperação do EGB no presente estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Infecções estreptocócicas; Streptococcus agalactiae; Manejo de espécimes (amostra); Meios de cultura; Mulheres grávidas

ABSTRACT

Purpose: to evaluate the influence of vaginal environment of pregnant women on group B streptococcus (GBS) survival after 8, 24 e 48 h in Amies and Stuart transport media. **Methods:** Three vaginal samples were collected from 30 pregnant women attending the Prenatal Care Outpatient Clinic of the Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). The first sample was placed directly onto Todd-Hewitt selective medium; the second was used to perform a gram-stained microscopy, and the third swab was placed in 2 mL physiological saline to which 200 µL of a suspension with $1-2 \times 10^8$ colony-forming units of GBS was added. After homogenization, six swabs were collected from this suspension (3 from Amie medium and 3 from Stuart medium). These six swabs were kept at room temperature for 8, 24 and 48 h and then incubated on blood agar. Bacterial growth at 37°C was observed after a 24-h incubation period and it was semiquantitatively graded (0-3+) according to the number of colonies. Statistical analysis was performed by the exact Fisher test and the level of significance was set at 0.05. **Results:** the recovery of GBS after 48-h storage in Amie and Stuart media was 97 e 87%, respectively. In one of the four cases where no GBS recovery was possible after 48 h of storage, vaginal pH was higher than 4.5, and in two of those cases cytolytic vaginosis was found. **Conclusions:** both transport media showed to be appropriate for GBS recovery up to 48 h after sampling. Characteristics of the vaginal environment did not influence GBS recovery as observed in this study.

KEYWORDS: Streptococcal infections; Streptococcal agalactiae; Transport handling; Vaginal environment; Pregnant women

Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Campinas (SP) - Brasil.

1. Professor Adjunto do Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Campinas (SP) - Brasil.
2. Acadêmico da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Campinas (SP) - Brasil, Bolsista de Iniciação Científica da FAPESP, processo N° 04/06712-3
3. Microbiologista do Laboratório de Microbiologia do Trato Genital Feminino, CAISM, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Campinas (SP) - Brasil.
4. Residente do Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Campinas (SP) - Brasil.

Correspondência: José Antonio Simões

Caixa postal: 6181, Cidade Universitária Zeferino Vaz - 13.083-970, Campinas, SP - Telefone: (19) 3289-2856 / (19) 3799-9306; Fax: (19) 3289-2440 - e-mail: jsimoes@caism.unicamp.br

Recebido em: 17/8/2005

Aceito com modificações em: 14/11/2005

Introdução

Streptococcus agalactiae, ou estreptococo do grupo B (EGB), são diplococos gram-positivos responsáveis por colonização e infecção em gestantes e neonatos¹. A maioria destas gestantes são assintomáticas, embora um em cada dois neonatos terão a superfície da pele ou mucosa colonizada. Aproximadamente 1 a 2% dos neonatos nascidos de mães colonizadas desenvolvem infecção neonatal precoce, tais como septicemia, pneumonia e meningite².

A colonização pelo EGB tem alta prevalência entre as gestantes, podendo atingir taxas de 15 a 30% no mundo todo^{3,4}. No Brasil, estudos demonstram prevalência de EGB de 14,9 a 21,6%, sendo esta prevalência maior nas gestantes com idade inferior a 20 anos e com menor escolaridade^{5,6}. Esta alta prevalência de EGB em gestantes é fator importante ao considerar-se que a taxa de transmissão vertical é de aproximadamente 50%⁷. Além disto, calcula-se que a incidência de infecção em RN seja da ordem de 1 a 3 por 1000 nascidos vivos⁸.

Para contornar este problema e no intuito de reduzir a morbimortalidade neonatal pelo EGB vêm sendo instituídas estratégias preventivas e terapêuticas intraparto em diferentes países, a partir das quais tem-se documentado significativo decréscimo da incidência de infecção neonatal precoce^{9,10}. A profilaxia antimicrobiana intraparto contra o EGB, segundo os *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), deve ser realizada em todas as gestantes colonizadas, o que previne pelo menos metade das infecções precoces, com decréscimo na incidência de infecção de 2,7 para 0,4 por 1000 nascidos vivos⁹.

Porém, grande obstáculo ao emprego da profilaxia da infecção estreptocócica em neonatos reside nas dificuldades de pronta identificação do EGB nas gestantes, idealmente realizada por meio de cultura em meio seletivo adequado, Todd-Hewitt. A opção disponível para isso na prática é a cultura em meios de rotina, como o ágar sangue. Entretanto, mesmo essa cultura de rotina muitas vezes é realizada em laboratórios microbiológicos distantes do local de atendimento da paciente. Isso pode resultar em intervalo de tempo entre a coleta e o processamento das amostras.

Para compensar esta demora existem meios de transporte capazes de preservar o EGB durante certo tempo após a coleta, garantindo a adequabilidade da amostra para as análises microbiológicas feitas mais tardiamente. O CDC padroniza que a viabilidade do EGB pode ser

mantida por até quatro dias em meio de transporte apropriado. Para isso há atualmente dois meios de transporte disponíveis no mercado nacional: Amies e Stuart. O meio de Stuart é um substrato para a conservação de *Neisseria gonorrhoeae* e outros microrganismos como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus* sp e *Corynebacterium diphtheriae*, durante o seu transporte para o laboratório. Já o meio Amies é uma modificação do meio Stuart, ao qual foram adicionados elementos para aumentar a sobrevivência bacteriana⁹.

Alguns estudos já foram realizados comparando estes dois meios para a preservação de EGBs, utilizando amostras obtidas de salina ou outro meio não natural^{11,12}. Porém, até onde sabemos nenhum estudo foi realizado no intuito de pesquisar se há diferenças significativas no tempo de preservação do EGB nesses dois meios considerando-se a influência do conteúdo vaginal.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do meio vaginal de gestantes sobre a recuperação do EGB nos meios de transporte Amies e Stuart.

Métodos

Foi realizado estudo de corte transversal no qual foram incluídas 30 gestantes atendidas em sua primeira consulta de rotina do Ambulatório de Pré-Natal do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no período entre outubro de 2004 e junho de 2005. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e todas as gestantes concordaram em participar do estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Como critério de inclusão considerou-se o primeiro atendimento pré-natal da gestante e como critério de exclusão a gestante já estar colonizada pelo EGB. Como é rotina deste serviço, exame ginecológico completo foi realizado nesta primeira consulta de pré-natal. Os dados relativos às características sociodemográficas e da gestação atual foram obtidos do prontuário. Além disso, as gestantes também foram questionadas quanto ao uso de antibióticos e antecedentes de infecções do trato gênito-urinário nos últimos seis meses, presença atual de corrimento vaginal e suas características.

Durante o exame especular, foi realizado o teste de *whiff* e a medição do pH vaginal. Para a realização do teste de *whiff* foram adicionadas duas

gotas de KOH 10% a uma fração da amostra coletada do fundo de saco vaginal, o qual foi considerado positivo na presença de liberação de odor de amins característico (odor de peixe). A medição de pH vaginal foi realizada colocando uma fita de pH em contato com a parede vaginal por um minuto e posterior leitura de acordo com uma escala colorimétrica.

Neste exame especular também foram coletados três *swabs* do fundo de saco vaginal, e que foram processados da forma descrita adiante: o primeiro *swab* foi mergulhado em caldo Todd-Hewitt, meio que é seletivo e serve para enriquecimento de EGB. Após incubação deste meio a 37°C por 24 horas, a amostra foi semeada em ágar sangue, a fim de verificar se a gestante já estava colonizada pelo EGB, o que a excluiria do estudo. Os resultados indicaram que as 30 gestantes incluídas não estavam colonizadas por EGB e, portanto, nenhuma delas teve que ser excluída do estudo.

O segundo *swab* foi utilizado para a realização de um esfregaço o qual foi corado pelo método de Gram, a fim de caracterizar a flora microbiana vaginal. Particularmente, este exame foi utilizado para o diagnóstico da presença de vaginose bacteriana, candidíase vaginal e vaginose citolítica.

O terceiro *swab* foi mergulhado em 2 mL de solução salina à qual foram acrescentados posteriormente 200 µL de uma suspensão previamente preparada contendo EGB da cepa ATCC 13818 (*Streptococcus agalactiae* - cepa padronizada) na concentração de $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC), correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland (padrão usado para calcular a densidade das suspensões bacterianas). Desta última suspensão de salina obtida com o terceiro *swab* colhido da paciente, foram obtidas três amostras para o meio de transporte Amies e três amostras para o meio de transporte Stuart. Estes foram mantidos em temperatura ambiente por 8, 24 e 48 horas para posterior semeadura em ágar sangue.

A seguir, estas placas foram incubadas a 37°C e, após 24 horas, foi realizada a verificação do crescimento do EGB nas mesmas. O crescimento foi classificado semiquantitativamente como 0 a 3+, dependendo da quantidade de colônias observadas em cada placa. Quando houve o crescimento de colônia típica (branca, leitosa com pequeno halo de hemólise) em 1/3, 2/3 ou em 3/3 da superfície da placa, o crescimento era categorizado como 1+, 2+ ou 3+, respectivamente. Na ausência de colônias, o crescimento era caracterizado como zero. A confirmação da identificação do EGB foi realizada com o teste da catalase.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste exato de Fisher, com nível de significância de 0,05.

Resultados

A Tabela 1 mostra que não houve diferença significativa na recuperação do EGB entre os dois meios de transporte testados após 8, 24 ou 48 horas de armazenamento em temperatura ambiente.

Tabela 1 - Comparação entre a recuperação do *Streptococcus* do grupo B (EGB) nos dois meios de transporte testados após 8, 24 e 48 horas de armazenamento em temperatura ambiente

Recuperação do EGB	Amies		Stuart		p*
	n = 30	%	n = 30	%	
Após 8 h	30	100	30	100	1,00
Após 24 h	30	100	29	97	1,00
Após 48 h	29	97	26	87	0,35

*Teste exato de Fisher.

Quanto às características da amostra vaginal, praticamente metade das gestantes avaliadas apresentaram pH vaginal igual ou superior a 4,5. Em 15 gestantes (50%) foi observada a presença de *Candida* sp e seis (20%) apresentaram vaginose bacteriana na bacterioscopia vaginal. Dez gestantes relataram história de uso de antibióticos nos últimos seis meses. Entretanto, destas que utilizaram antibiótico, apenas quatro o haviam feito nas últimas duas semanas que antecederam a coleta (Tabela 2).

Tabela 2 - Características clínicas e antecedente de uso de antibióticos nas gestantes.

Características	n (30)	(%)
pH vaginal $\geq 4,5$	14	47
Teste de <i>whiff</i> positivo	1	3
Uso de antibióticos	10 ^a	33
Presença de vaginose bacteriana ^b	6	20
Presença de candidíase vaginal ^b	15	50
Presença de vaginose citolítica ^b	5	14

^aEm uso de penicilina (3), cefalexina (1); tetraciclina/anfotericina B-tópico (1); não souberam informar qual o antibiótico utilizado (5).

^bDiagnosticados pela bacterioscopia do conteúdo vaginal.

Tabela 3 - Comparação das características avaliadas entre os casos nos quais não houve recuperação do estreptococo do grupo B após 48 horas com aqueles nos quais houve a recuperação nos dois meios de transporte.

Características	Houve recuperação do EGB		Não houve recuperação do EGB		p*
	após 48 h		após 48 h ^a		
	n = 26	%	n = 4	%	
	pH vaginal $\geq 4,5$	13	50	1	
Teste de <i>whiff</i> positivo	1	4	0	-	1,00
Uso de antibióticos	10	38	0	-	0,27
Presença de vaginose bacteriana	6	23	0	-	0,55
Presença de candidíase vaginal	14	54	1	25	0,59
Presença de vaginose citolítica	3	11	2	50	0,11

^aRefere-se aos quatro casos em que não houve recuperação do EGB no meio Stuart (em um dos quais também não houve recuperação no meio Amies).

*Teste exato de Fisher.

A Tabela 3 mostra a comparação das características avaliadas entre os casos em que houve e aqueles em que não houve recuperação do EGB após 48 de armazenamento nos dois meios de transporte. Observa-se que entre os quatro casos em que não houve recuperação do EGB, dois apresentaram vaginose citolítica, um apresentou candidíase e um apresentou pH vaginal $\geq 4,5$. Todavia, estes resultados não foram significativamente diferentes em comparação com os casos em que houve recuperação do EGB.

Discussão

A sobrevivência do EGB nos meios de transporte não-específicos manteve-se em níveis aceitáveis após 48 horas de estocagem, tanto no meio Amies como no Stuart (97 e 87%, respectivamente). Estes resultados são compatíveis com os de Crisp et al.¹³, que não encontraram diferença significativa entre a recuperação do EGB quando em inoculação direta no meio seletivo ou após o uso de um meio de transporte. Entretanto, deve-se ressaltar que nos trabalhos daqueles autores o tempo em que os *swabs* permaneceram no meio de transporte foi de apenas duas horas.

Por outro lado, Silver e Struminsky¹⁴, utilizando dois *swabs* na coleta, compararam a inoculação direta no meio seletivo de Todd-Hewitt e sua inoculação posterior ao uso do meio de transporte Stuart. Verificaram que a inoculação após o uso do meio de transporte apresentou perda de 30% na recuperação do EGB.

Uma das possíveis variáveis que podem influenciar na recuperação do EGB após um período de permanência no meio de transporte é a temperatura em que o mesmo é armazenado. No presente estudo, utilizou-se a temperatura ambiente para o armazenamento dos meios de transporte até o momento de semeadura em placa de ágar sangue. Portanto, esta variável não deve ter influenciado na recuperação do EGB, pois tanto a temperatura ambiente (24°C) como a obtida em geladeira (3°C) são as mais adequadas para melhor sobrevivência do EGB em um meio de transporte¹¹. Somente a estocagem prolongada em temperaturas elevadas (como 30°C) diminui a viabilidade do EGB e afeta diretamente a habilidade da cultura para sua detecção.

Outra variável com influência potencial sobre os novos resultados é o uso de antibióticos. Dentre as quatro mulheres em que não houve recuperação do EGB após 48 horas, o uso de antibiótico nas últimas duas semanas não foi referido

pelas mesmas. Por outro lado, nas outras quatro mulheres que referiram ter usado antibiótico nas duas últimas semanas também houve recuperação do EGB após 48 horas de armazenamento. Outros estudos demonstraram que, na presença de antibióticos *in vitro* (penicilina e eritromicina), houve crescimento de EGB somente nas culturas imediatas, não havendo crescimento após 6, 12 e 24 horas de armazenamento em meios de transporte¹². O fato de o uso prévio de antibiótico não ter influenciado na recuperação do EGB no presente estudo sugere que não há necessidade desta preocupação na ocasião da coleta para pesquisa do EGB entre as gestantes.

Possível explicação para os quatro casos que não apresentaram recuperação do EGB após 48 horas de armazenamento em meio de transporte seria que a concentração do inóculo tenha sido menor, demonstrado por menor crescimento já na primeira semeadura (após 8 horas de armazenamento). Contudo, isso só foi observado em um dos quatro casos, o que torna essa explicação pouco provável. Isso ainda é reforçado por estudos anteriores, nos quais concentrações muito baixas de EGB (menos que 10 UFC por *swab*) foram suficientes para uma recuperação de 80% dos mesmos após dois dias de armazenamento¹¹.

A análise das características do meio vaginal que foi realizada no presente estudo demonstrou que a *Candida* sp foi encontrada com frequência na vagina das mulheres avaliadas (metade dos casos), uma vez que a candidíase é a infecção vaginal mais freqüente durante a gestação¹⁵. Entretanto, também encontramos freqüência elevada de pH vaginal $\geq 4,5$ (47% dos casos) e de outras infecções vaginais como a vaginose bacteriana e a vaginose citolítica (20 e 14%, respectivamente). Isso pode ser explicado pelo fato de que o ambulatório onde foram coletadas as amostras é um serviço de referência para as gestações de alto risco. Inclusive isso contribuiu favoravelmente ao nosso estudo, permitindo a obtenção de maior variedade de meios vaginais.

As condições de estocagem da amostra e presença de antibióticos e de produtos de higiene feminina podem influenciar várias destas condições. Os resultados afetam negativamente a cultura do EGB¹². Os autores deste estudo, no entanto, não demonstraram quais fatores poderiam influenciar a recuperação do EGB em relação ao meio vaginal (como muco, sangue e flora vaginal). No estudo atual encontrou-se que em apenas um dos quatro casos em que não houve a recuperação do EGB após 48 horas de armazenamento, o pH vaginal foi superior a 4,5. Além disso, em dois casos havia a presença de vaginose citolítica, que também as-

socia-se a pH mais ácido. Infelizmente, não é possível estabelecer, com o tamanho da amostra estudada, se a acidez vaginal é realmente um fator que pode influenciar negativamente a recuperação do EGB. Futuros estudos com tamanho amostral maior devem ser realizados com essa finalidade.

Em conclusão, os dados do presente estudo reforçam a orientação atual de utilizar-se como alternativa um meio de transporte inespecífico para a pesquisa do EGB em gestantes. O armazenamento deste meio por até 48 horas em temperatura ambiente não influencia a recuperação do EGB nos dois meios avaliados. Além disso, não houve influência significativa do meio vaginal na recuperação do EGB após o período de armazenamento.

Agradecimentos

Agradecemos à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro através da bolsa de Iniciação Científica outorgada à autora Giana B. Poletti.

Referências

- Zangwill KM, Schuchat A, Wenger JD. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. *MMWR CDC Surveill Summ.* 1992;41(6):25-32.
- Schuchat A. Group B streptococcal disease: from trials and tribulations to triumph and trepidation. *Clin Infect Dis.* 2001;33(6):751-6.
- Hickman ME, Rench MA, Ferrieri P, Baker CJ. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics.* 1999;104(2 Pt 1):203-9.
- Moyo SR, Mudzori J, Tswana SA, Maeland JA. Prevalence, capsular type distribution, anthropometric and obstetric factors of group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*) colonization in pregnancy. *Cent Afr J Med.* 2000;46(5):115-20.
- Pogere A, Zoccoli CM, Tobouti NR, Freitas PF, D'Acampora AJ, Zunino JN. Prevalência da colonização pelo estreptococo do grupo B em gestantes atendidas em ambulatório pré-natal. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005;27(4):174-80.
- Beraldo C, Brito ASJ, Saridakis HO, Matsuo T. Prevalência da colonização vaginal e anorretal por estreptococo do grupo B em gestantes do terceiro trimestre. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2004;26(7):543-9.
- Pereira PP, Lautenschlager MAC, Maganha GA, Armelin AR, Zugaib M. Streptococcus agalactiae e gravidez: histórico, atualidades e perspectivas. *Rev Ginecol Obstet.* 2002;13(3):163-6.
- Edwards MS, Baker CJ. Streptococcus agalactiae (Group B Streptococcus). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. New York: Churchill Livingstone; 2000. p. 2156-67.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory practices for prenatal group B streptococcal screening: seven states, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004;53(23):506-9.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hospital-based policies for prevention perinatal Group B streptococcal disease: United States, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2000;49(41):936-40.
- Stoner KA, Rabe LK, Hillier SL. Effect of transport time, temperature, and concentration on the survival of group B streptococci in Amies transport medium. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):5385-7.
- Ostroff RM, Steaffens JW. Effect of specimen storage, antibiotics, and feminine hygiene products on the detection of group B Streptococcus by culture and the STREPT B OIA test. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1995;22(3):253-9.
- Crisp BJ, Yancey MK, Uyehara C, Nauschuetz WF. Effect of delayed inoculation of selective media in antenatal detection of group B streptococci. *Obstet Gynecol.* 1998;92(6):923-5.
- Silver HM, Struminsky J. A comparison of the yield of positive antenatal group B streptococcus cultures with direct inoculation in selective growth medium versus primary inoculation in transport medium followed by delayed inoculation in selective growth medium. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;175(1):155-7.
- Simoes JA, Giraldo PC, Faundes A. Prevalence of cervicovaginal infections during gestation and accuracy of clinical diagnosis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1998;6(3):129-33.