

Estudio comparativo de tres medios de cultivo para detectar la colonización por estreptococo del grupo B en la mujer embarazada

Jordi Bosch-Mestres, Rosa María Martín-Fernández y María Teresa Jiménez de Anta-Losada

Servicio de Microbiología. Institut Clínic d'Infeccions i d'Immunología. Corporació Sanitària Clínic. Barcelona. España.

OBJETIVO. Comparar la eficacia de tres medios de cultivo para detectar la colonización vaginal y rectal por *Streptococcus agalactiae* o estreptococo del grupo B (EGB) en mujeres gestantes.

MÉTODOS. Se procesaron 1.334 muestras pertenecientes a 861 gestantes: en 388 pacientes se cultivó sólo frotis vaginal (grupo A) y en 473, frotis vaginal y rectal (grupo B). Las muestras se sembraron en agar sangre con colistina y ácido nalidíxico (AS-ANC), en medio de Granada en placa y en caldo Todd-Hewitt (CTH) con amikacina y posterior resiembra en AS-ANC.

RESULTADOS. Se aisló EGB en 181 muestras (13,6%): 114 vaginales (13,2%) y 67 rectales (14,2%). De las muestras positivas, se aisló EGB en AS-ANC en un 60,5% de los frotis vaginales y en un 59,7% de los rectales; en medio de Granada en un 80,7% de los frotis vaginales y en un 91% de los rectales, y en CTH en un 97,4% de los frotis vaginales y en un 97% de los rectales.

Se detectaron 130 portadoras de EGB: 54 (13,9%) en el grupo A (estudio vaginal) y 76 (16,1%) en el grupo B (estudio vaginal y rectal). En ambos grupos de estudio A y B, el porcentaje de portadoras detectadas fue respectivamente del 59,3 y 75% en AS-ANC, del 77,8 y 93,4% en medio de Granada y del 96,3 y 97,4% en CTH.

CONCLUSIONES. El CTH fue el medio más eficaz para detectar EGB. La utilización del medio de Granada permitió la detección rápida de casi un 87% de las portadoras.

La combinación del CTH con la placa inicial de medio de Granada o de AS-ANC permitió detectar más del 99% de las portadoras de EGB.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*. Estreptococo del grupo B. Medio de Granada. Caldo Todd-Hewitt. Colonización vaginal. Embarazo.

Comparative study of three culture media for detecting group B *Streptococcus* colonization in pregnant women

OBJECTIVE. To compare the efficacy of three culture media to detect vaginal and rectal colonization by group B streptococci (GBS) in pregnant women.

METHODS. We processed 1334 samples from 861 pregnant women: in 388 patients only vaginal swab was cultured (Group A) and in 473 vaginal and rectal swabs were cultured (Group B). Samples were inoculated on blood agar with colistin-nalidixic acid (BA-CNA), on plates with Granada medium, and on Todd-Hewitt broth (THB) with amikacin followed by subculture in BA-CNA.

RESULTS. GBS was isolated in 181 samples (13.6%): 114 vaginal swabs (13.2%) and 67 rectal swabs (14.2%). Among the positive samples, GBS was isolated on BA-CNA in 60.5% of vaginal swabs and in 59.7% of rectal swabs, on Granada medium in 80.7% of vaginal swabs and in 91% of rectal swabs, and on THB in 97.4% of vaginal swabs and in 97% of rectal swabs.

We detected 130 GBS carriers, 54 (13.9%) in Group A and 76 (16.1%) in Group B. The percent of carriers detected in groups A and B, respectively, was 59.3% and 75% with BA-CNA, 77.8% and 93.4% with Granada medium, and 96.3% and 97.4% with THB.

CONCLUSIONS. THB was the most reliable medium for the detection of GBS. Use of Granada medium allows fast detection of about 87% of carriers. The combination of THB and an initial plate of Granada medium or BA-CNA allows detection of more than 99% of GBS carriers.

Key words: *Streptococcus agalactiae*. Group B streptococci. Granada medium. Todd-Hewitt broth. Vaginal colonization. Pregnancy.

Introducción

La detección de *Streptococcus agalactiae* o estreptococo del grupo B (EGB) en la vagina y/o el recto de las mujeres embarazadas y la administración de profilaxis antibiótica intraparto en las portadoras es actualmente el método más eficaz y el más recomendado para prevenir la infección neonatal precoz por EGB¹⁻⁴.

La elección del medio de cultivo para detectar EGB en escobillones vaginales y/o rectales puede influir de forma

Correspondencia: Dr. J. Bosch-Mestres.
Servicio de Microbiología. Hospital Clínic (Maternidad).
Sabino de Arana, 1. 08028 Barcelona. España.
Correo electrónico: jobosch@clinic.ub.es

Manuscrito recibido el 19-07-2002; aceptado el 23-12-2002.

importante en la eficacia de esta medida, ya que son diversos los medios de cultivo que se utilizan para este fin.

Por este motivo, hemos realizado un estudio comparativo de tres medios de cultivo con el objetivo de investigar su eficacia en la detección de gestantes portadoras de EGB.

Métodos

Pacientes

Durante un período de 4 meses (de marzo a junio del 2001) se procesaron 1.334 muestras: 861 escobillones vaginales y 473 escobillones rectales pertenecientes a 861 mujeres gestantes. En 388 pacientes se realizó sólo cultivo de escobillón vaginal (grupo A) y en 473 pacientes se cultivaron por separado un escobillón vaginal y otro rectal (grupo B).

Métodos microbiológicos

Las muestras de vagina y de recto se obtuvieron con escobillones que fueron inoculados en medio de transporte de Amies y conservados a temperatura ambiente hasta el momento de su siembra en:

1. Una placa de agar sangre con colistina y ácido nalidíxico (AS-ANC, bioMérieux), incubada a 37 °C en atmósfera con un 5% de dióxido de carbono (CO₂) durante 48 h.
2. Un cuarto de placa de medio de Granada (Biomedics), incubada a 37 °C en jarras con atmósfera de anaerobiosis durante 48 h.
3. Un tubo con 2 ml de caldo Todd-Hewitt (CTH, Oxoid) suplementado con 5% de suero de caballo (bioMérieux) y 15 µg/ml de amikacina (Normon), incubado a 37 °C durante 24 h con posterior resiembra con asa calibrada de 10 µl en media placa de AS-ANC que se incubó 24 h a 37 °C en atmósfera con un 5% de CO₂.

La identificación de las colonias de EGB se realizó mediante: *a*) producción de pigmento naranja en medio de Granada; *b*) aglutinación de partículas de látex (bioMérieux), y *c*) en los casos dudosos mediante pruebas bioquímicas: hidrólisis del hipurato, bilis-esculina y pyrrolidinil-aminopeptidasa (Rosco).

Resultados

Detección de EGB en muestras vaginales y rectales

Se aisló EGB en 181 muestras (13,6%): 114 de los 861 escobillones vaginales (13,2%) y 67 de los 473 escobillones rectales (14,2%).

De las 181 muestras positivas (114 vaginales y 67 rectales), se aisló EGB en AS-ANC en 109 muestras: en 69 frotis vaginales (sensibilidad del 60,5%) y en 40 frotis rectales (59,7%); en medio de Granada en 153 muestras: en 92 frotis vaginales (80,7%) y en 61 frotis rectales (91%); y en CTH en 176 muestras: en 111 frotis vaginales (97,4%) y en 65 frotis rectales (97%) (fig. 1).

Detección de portadoras de EGB

Se detectaron 130 portadoras de EGB: 54 (13,9%) en el grupo A (escobillón vaginal) y 76 (16,1%) en el grupo B (escobillón vaginal y rectal). En este último grupo, 51 pacientes eran portadoras vaginales y rectales (67,1%), nueve sólo portadoras vaginales (11,8%) y 16 sólo portadoras rectales (21,1%).

En ambos grupos de estudio, el porcentaje de portadoras detectadas fue respectivamente del 59,3 y 75% con AS-ANC, del 77,8 y 93,4% con medio de Granada y del 96,3 y 97,4% con CTH. La combinación de

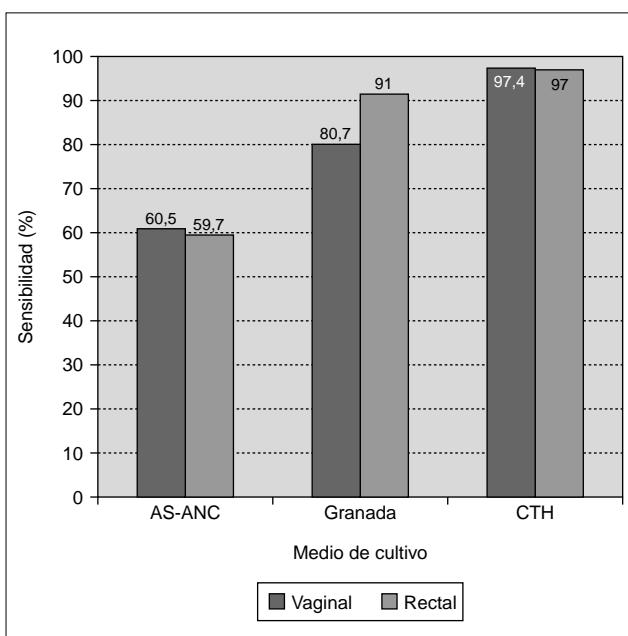


Figura 1. Porcentaje de aislamiento de EGB en cada medio de cultivo sobre el total de cultivos positivos. AS-ANC: agar sangre con colistina y ácido nalidíxico; CTH: caldo de Todd-Hewitt.

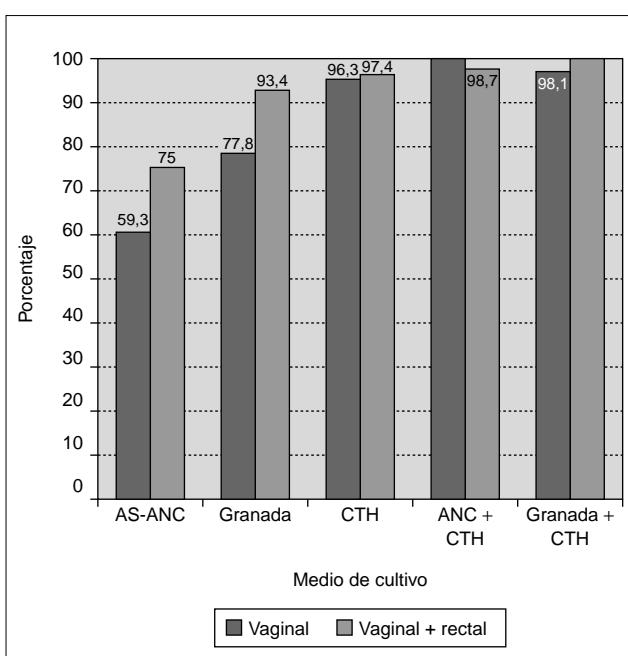


Figura 2. Porcentaje de portadoras de EGB detectadas en cada medio de cultivo sobre el total de portadoras. AS-ANC: agar sangre con colistina y ácido nalidíxico; CTH: caldo de Todd-Hewitt.

AS-ANC o medio de Granada y CTH detectó todas excepto una de las portadoras de EGB, es decir, un 99,3% (fig. 2). Una paciente estaba colonizada en vagina por una cepa no betahemolítica que sólo se detectó en la placa inicial de AS-ANC, mientras que otra paciente

presentaba exclusivamente colonización rectal que sólo se detectó en medio de Granada.

Discusión

En nuestro estudio, el cultivo en AS-ANC ha demostrado poseer una eficacia limitada para la detección de EGB; sólo ha detectado un 60% de muestras positivas, aunque la combinación del cultivo de escobillón vaginal y rectal ha permitido detectar al 75% de las portadoras.

El AS-ANC no es un medio de enriquecimiento, y su selectividad para detectar estreptococos es moderada⁵, ya que la presencia de colistina y ácido nalidíxico permite la inhibición de bacterias gramnegativas, pero no de estafilococos y levaduras, que pueden enmascarar el crecimiento de EGB. Además, la detección de EGB se realiza en función de la existencia de betahemólisis, que puede verse inhibida ante la presencia de colonias alfahemolíticas de otros estreptococos y de lactobacilos.

Algunos autores han comprobado que la utilización de un aminoglucósido como la neomicina, junto con el ácido nalidíxico, incrementa la selectividad del medio y permite obtener mejores resultados⁶. Evidentemente, la utilización de agar sangre sin antibióticos posee una nula selectividad que implica todavía unos peores resultados^{7,8}.

Se ha descrito que un bajo porcentaje de cepas de EGB (menos del 2%) no produce betahemólisis, por lo que estas cepas serían difícilmente identificables, aunque un observador experimentado es capaz de hacerlo en algunos casos en que se obtiene un crecimiento puro y abundante en este medio de cultivo.

El CTH es el medio de enriquecimiento más utilizado para EGB y el recomendado por el Center for Disease Control (CDC)^{4,9-11}. En nuestro estudio ha detectado un 97% de las muestras positivas y el mismo número de portadoras de EGB, siendo el medio más eficaz de los tres probados.

En general, para el crecimiento de estreptococos son aptos diversos caldos de cultivo y todos se han utilizado para detectar EGB, como el caldo de tioglcolato¹² o el caldo de Mueller-Hinton⁵. Los falsos negativos observados al utilizar un caldo selectivo pueden deberse al sobrecrecimiento de otras bacterias, especialmente de enterococos¹³ o a la inhibición de algunas cepas de EGB por los aminoglucósidos del caldo¹⁴.

Hemos observado que la adición de suero o de sangre favorece el crecimiento de EGB y consigue mejores resultados, sobre todo en los cultivos mixtos con enterococos que podrían enmascarar la presencia de EGB en la resiembra en placa.

La adición de antibióticos como gentamicina y ácido-nalidíxico permite la inhibición de bacterias gramnegativas y de estafilococos; nosotros hemos utilizado para este fin la adición de amikacina, ya que con un solo antibiótico se consigue una selectividad similar. Previamente habíamos descrito la posibilidad de obtener un medio selectivo disco-caldo para EGB, mediante la adición de un disco de antibiograma de 30 µg de amikacina a 2 ml de CTH⁵, que puede ser de utilidad en laboratorios con un número limitado de muestras.

La resiembra posterior del caldo en AS-ANC permite la detección de EGB por su betahemólisis. Algunos

enterococos poseen cierta actividad betahemolítica, lo que obliga a realizar pruebas de aglutinación o bioquímicas para confirmar la presencia de EGB.

El medio de Granada en placa es un medio selectivo y diferencial^{8,15,16}, aunque no de enriquecimiento, para EGB, con una composición similar a otros descritos¹⁷⁻²⁰. Los antimicrobianos que lleva incorporados permiten la inhibición de bacterias gramnegativas, estafilococos y levaduras, y facilita el crecimiento de estreptococos y enterococos.

La presencia de inhibidores del ácido fólico induce el desarrollo de un pigmento naranja específico de EGB, en particular cuando se incuba en condiciones de anaerobiosis, lo que sirve para diferenciarlo de otros estreptococos y de los enterococos. Las cepas de EGB no betahemolíticas carecen también de capacidad para producir pigmento.

En nuestro estudio, este medio ha sido positivo en un 80% de las muestras vaginales con EGB y en un 91% de las rectales, y la combinación de ambas muestras ha detectado a un 93% de las portadoras. Hemos observado que un cierto número de pacientes presenta probablemente una densidad de colonización por EGB muy baja, sobre todo en la vagina, que sólo puede ser detectada mediante el empleo de un caldo de enriquecimiento.

Por otro lado, la presencia de pigmento naranja permite una identificación rápida (en 18-24 h) y segura de EGB. No creemos que el hecho de utilizar un cuarto de placa sea la causa de haber obtenido peores resultados, ya que el medio consigue una diferenciación perfecta de cualquier colonia de EGB que crezca. El empleo de un cuarto de placa de medio de Granada ha supuesto en cambio un notable ahorro económico, ya que el coste de este medio es elevado, y también ha disminuido la cantidad de placas incubadas en jarras con atmósfera de anaerobiosis en nuestro laboratorio.

Recientemente, algunos autores han descrito que la incubación de las placas de medio de Granada en aerobiosis, tras cubrir la zona inoculada con un cubreobjetos, permite el mismo desarrollo de pigmento que su incubación en condiciones de anaerobiosis²¹. Por otra parte, algunos autores han desaconsejado el empleo del medio de Granada en tubo²² ya que, en determinadas condiciones, puede producir un número importante de falsos negativos.

Los mejores resultados los hemos obtenido con la combinación de un medio en placa, AS-ANC o medio de Granada, y un tubo de CTH. Esta combinación ha detectado un 99,3% de las portadoras de EGB. Según estos resultados, el protocolo utilizado actualmente en nuestro laboratorio es el siguiente:

1. Siembra en un cuarto de placa de medio de Granada incubado en anaerobiosis y en un tubo de CTH en las muestras de vagina y de recto en las que se solicita exclusivamente cultivo selectivo de EGB, y se reciben en el horario normal de funcionamiento del laboratorio.

2. Siembra en una placa de AS-ANC y en un tubo de CTH en las muestras en las que se solicita cultivo vaginal no selectivo de EGB (en sospecha de enfermedad de transmisión sexual, amniorrexis prematura y/o prolongada, etc.) y se inoculan otros medios de cultivo

(agar Sabouraud, agar chocolate, agar Thayer-Martin y, en ocasiones, agar McConkey), y en las muestras de vagina y de recto para cultivo selectivo de EGB que se reciben en horario de urgencias.

El empleo, desde 1997 del CTH, conjuntamente con AS-ANC y posteriormente con medio de Granada para la detección de EGB, y la posterior administración de profilaxis antibiótica intraparto a las gestantes portadoras, ha reducido de manera drástica la incidencia de sepsis neonatal precoz por EGB en nuestro hospital, hasta unas cifras de 0,18 casos por cada mil recién nacidos vivos durante el período 1997-2001.

Bibliografía

1. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: A public health perspective. MMWR 1996;45 (No. RR-7):1-24.
2. Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología, Sociedad Española de Neonatología. Recomendaciones para la prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Prog Obstet Ginecol 1998;41:431-5.
3. Andreu A, De la Rosa M, Cabero L. Justificación de una política de prevención de la enfermedad perinatal por estreptococo del grupo B (EGB). Recomendaciones. Enferm Infect Microbiol Clin 1999;17:138-40.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. MMWR 2002; 51 (No. RR-11): 1-22.
5. Bosch J, Murillo S, Rico M, Salgado M. Utilidad de un medio selectivo disco-caldo para la detección de estreptococo del grupo B en la vagina. Enferm Infect Microbiol Clin 1998;16:83-4.
6. Dunne WM Jr. Comparison of selective broth medium plus neomycin-nalidixic acid agar and selective broth medium plus Columbia colistin-nalidixic acid agar for detection of group B streptococcal colonization in women. J Clin Microbiol 1999;37:3705-6.
7. Altaie SS, Dryja D. Detection of group B *Streptococcus*. Comparison of solid and liquid culture media with and without selective antibiotics. Diagn Microbiol Infect Dis 1994;18:141-4.
8. Claeys G, Verschraegen G, Temmerman M. Modified Granada agar medium for the detection of group B *Streptococcus* carriage in pregnant women. Clin Microbiol Infect 2001;7:22-4.
9. Boyer KM, Gadzala CA, Kelly PD, Burd LI, Gotoff SP. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. J Infect Dis 1983;148:802-9.
10. Philipson EH, Palermino DA, Robinson A. Enhanced antenatal detection of group B *Streptococcus* colonization. Obstet Gynecol 1995;85:437-9.
11. Platt MW, McLaughlin JC, Gilson GJ, Wellhoner MF, Nims LJ. Increased recovery of group B *Streptococcus* by the inclusion of rectal culturing and enrichment. Diagn Microbiol Infect Dis 1995;21:65-8.
12. Yancey MK, Schuchat A, Brown LK, Ventura VL, Markenson GR. The accuracy of late antenatal screening cultures in predicting genital group B streptococcal colonization at delivery. Obstet Gynecol 1996;88:811-5.
13. Dunne WM Jr, Holland-Staley CA. Comparison of NNA agar culture and selective broth culture for detection of group B streptococcal colonization in women. J Clin Microbiol 1998;36:2298-300.
14. Persson KM, Forsgren A. Evaluation of culture methods for isolation of group B streptococci. Diagn Microbiol Infect Dis 1987;6:175-7.
15. De la Rosa M, Pérez M, Carazo C, Pareja L, Peis JI, Hernández F. New Granada medium for detection and identification of group B streptococci. J Clin Microbiol 1992;30:1019-21.
16. Uh Y, Jang IH, Yoon KJ, Lee CH, Kwon JY, Kim MC. Colonization rates and serotypes of group B streptococci isolated from pregnant women in a korean tertiary hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997;16:753-6.
17. Reardon EP, Noble MA, Luther ER, Wort AJ, Bent J, Swift M. Evaluation of a rapid method for the detection of vaginal group B streptococci in women in labor. Am J Obstet Gynecol 1984;148:575-8.
18. Christensen K, Christensen P. A screening test (GBS-test) for urogenital carriage of group B streptococci. Am J Obstet Gynecol 1987;157:341-2.
19. Mukerjee C, Heron LG, Varettas K. Group B *Streptococcus* screening in pregnant women: A comparison of three media. Pathology (Eng) 2000;32: 46-8.
20. Votava M, Tejkalowa M, Drabkova M, Unzeiting V, Bravny I. Use of GBS media for rapid detection of group B streptococci in vaginal and rectal swabs from women in labor. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001;20:120-2.
21. Rosa-Fraile M, Rodríguez-Granger J, Cueto-López M, Sampedro A, Biel-Gaye E, Haro JM, et al. Use of Granada medium to detect group B streptococcal colonization in pregnant women. J Clin Microbiol 1999; 37:2674-7.
22. Gil EG, Rodríguez MC, Bartolomé R, Berjano B, Cabero L, Andreu A. Evaluation of the Granada agar plate for detection of vaginal and rectal group B streptococci in pregnant women. J Clin Microbiol 1999;37:2648-51.