

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

INCIDÊNCIA DE COLONIZAÇÃO RETOVAGINAL POR *Streptococcus agalactiae* EM GESTANTES E AVALIAÇÃO DE CULTURA DE *SWABS* COMBINADOS

Aluna: Talita Trevizani Rocchetti

Orientadora: Marcia Guimarães da Silva

Co-orientadora: Vera Lucia Mores Rall

Projeto de Iniciação Científica apresentada ao Departamento Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP - Campus Botucatu para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

BOTUCATU – SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Rocchetti, Talita Trevizani.

Incidência de colonização retovaginal por *Streptococcus agalactiae* em gestantes e avaliação de cultura de WWBS combinados / Talita Trevizani Rocchetti. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientadora Maria Guimarães da Silva

Co-orientador: Vera Lucia Mores Rall

1. Microbiologia 2. *Streptococcus agalactiae* 3. Gravidez - Infecção

Palavras-chave: Colonização materna; Fatores de risco; Flora vaginal; *Streptococcus agalactiae*; Swabs combinados

DEDICATÓRIA

*A Deus
Pela força,
por estar ao meu lado e
por acreditar na minha
capacidade de superação.*

*A minha família
Meu Pai, minha mãe e meus irmãos queridos...
Por toda luta e conquista que tivemos juntos*

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, **Vanderlei**, que mesmo não mais presente, estará sempre na minha memória, sendo uma inspiração e um motivo de orgulho.

A minha mãe, **Maria Regina**, por estar sempre ao meu lado, me ensinando, me apoiando e contribuindo na minha formação pessoal e profissional.

Aos meus irmãos, **Thiago e Taisa**, pelo amor e por estarem sempre ao meu lado, me sinto muito mais forte com vocês por perto.

Em especial ao meu **Tio Duda**, por tudo que fez por mim, pelo carinho e atenção que teve ao me proporcionar caminhos para a conquista do meu objetivo.

A minha orientadora **Márcia Guimarães da Silva**, por toda orientação, ensinamento e atenção que teve comigo, sendo para mim uma inspiração pessoal e profissional.

A minha orientadora **Vera Lucia Mores Rall** pela dedicação, orientação e conversas, me guiando tanto profissionalmente quanto pessoalmente, tornando meu trabalho possível.

As grandes companheiras de lar e minhas grandes amigas, Tatiana (**Rexona**), pelas gostosas conversas, Andréia (**Garrinxá**) pelos momentos de muito riso e alegria, a minha mais do que amiga, irmã, Adriana (**Xevetão**) pelos anos de convivência e grande amizade e ao sorriso da casa Flávia (**Kalose**) em quem descobri uma grande amiga, nunca vou me esquecer o valor que foi dado as nossas amizades e por tudo que vocês fizeram por mim. Com grande tristeza me despeço da **Republica Rabo de saia**, conheci aqui grandes amigas que me mostraram como uma amizade pode ser forte e valiosa, vocês foram e sempre serão a minha família em Botucatu.

As minhas colegas do Departamento de Patologia, **Bruna, Jossimara, Eliane, Carol, Larissa e a Dutra** que estavam sempre por perto, meninas obrigada pelo apoio e

por alegrarem os meus dias. Em especial agradeço a **Camila**, por todo apoio e dedicação, por toda orientação, amizade e carinho.

Aos meus colegas do Departamento de Microbiologia em particular a **Juliana**, **ao Marcos (Mábio)** e a **Simone**, pela companhia, paciência, por toda ajuda na minha monografia, aprendi muito com vocês.

Aos técnicos de laboratório, **Tino**, **Ademival**, **Pedro e Lula** por todo carinho.

Aos amigos da **Juntinho no Escurinho- JNE**, em especial Ricardo (**Sissão**) e Rafael (**Giletão**) por todo carinho e os anos juntos, pela grande amizade que temos.

Aos amigos de Botucatu, em especial ao **Matheus**, pela companhia, carinho e amizade tanto na sala de aula quanto nos encontros de fim de semana.

A toda XXXIX, lembrarei com carinho todos os momentos que tivemos juntos, foi muito bom dividir estes cinco anos com todos vocês.

A todos aqueles que compartilharam comigo algum momento aqui em Botucatu, muito obrigada pelo aprendizado e pela companhia.

SUMÁRIO

1. Introdução	8
2. Objetivos	13
3. Pacientes e Método	15
3.1. Casuística.....	16
3.2. Colheita das amostras.....	16
3.3. Processamento das amostras coletadas para pesquisa de <i>Streptococcus</i>	17
3.4. Isolamento dos microrganismos.....	17
3.5. Identificação de <i>Streptococcus agalactiae</i>	18
3.6. Exame microscópico do conteúdo vaginal.....	20
3.6.1 Critérios de diagnóstico laboratorial das infecções genitais.....	20
3.7 Análise estatística	21
4. Resultados	23
4.1. Incidência de colonização por <i>Streptococcus agalactiae</i> e características.....	24
4.2. Avaliação de swabs combinados para isolamento de <i>Streptococcus agalactiae</i>	29
5. Discussão	30
6. Referências Bibliográficas	37
7. Anexos	44
8. Artigos publicados	47

RESUMO

A identificação de fatores de risco para colonização vaginal materna por *Streptococcus agalactiae* tem sido objeto de estudo na literatura mundial pois essa colonização frequentemente é assintomática e pode causar bacteremia nos recém-nascidos, com significativa morbidade e mortalidade, especialmente em prematuros. O objetivo do estudo foi associar a colonização por *S. agalactiae* com o padrão da microbiota vaginal das gestantes e avaliar a eficácia de swabs combinados na detecção de *S. agalactiae*. Foram incluídas no estudo 405 gestantes em idade gestacional entre 35 e 37 semanas, atendidas no Pré-Natal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Utilizando-se swabs estéreis foram obtidas amostras da região anorretal, do intróito vaginal e do terço distal da parede vaginal. O material coletado foi cultivado em caldo Todd Hewit suplementado com colistina (10µg/mL) e ácido nalidíxico (15µg/mL), por 18 a 24 horas à 37°C, em seguida, realizada subcultura em ágar-sangue a 5% sob as mesmas condições. As colônias sugestivas de *S. agalactiae* foram submetidas a coloração de Gram e ao teste da catalase e ao CAMP test. O padrão de microbiota vaginal foi avaliado empregando-se a técnica de coloração de Gram. Os dados sócio-demográficos e obstétricos foram obtidos por formulário próprio. Considerando como variável resposta a colonização materna ou não por *S. agalactiae*, foi ajustado um modelo de regressão logística adotando o método stepwise, considerando as variáveis explanatórias quantitativas e qualitativas. Para positividade de cultura em swabs combinados e isolados foi empregado o teste de Tukey. colonização materna por *S. agalactiae* foi de 25,4%. Em relação à microbiota vaginal, as alterações mais freqüentes foram vaginose citolítica (11,3%) seguido de vaginose bacteriana (10,9%), candidíase (8,2%) e Flora II (8,1%). Ajustando-se o modelo de regressão logística, tem-se que a idade materna, número de relações sexuais/semana, presença de aborto espontâneo, presença de candidíase e vaginose citolítica foram as variáveis que se associaram à essa colonização. Considerando o local de coleta, do total de gestantes que apresentaram positividade para *S. agalactiae* (103), 14,5% tiveram culturas positivas simultaneamente para IV e PV; 5,8 % para IV e RA e 3,9% para PV e RA. Culturas positivas para os 3 locais de coleta foram observadas em 47,5% das pacientes incluídas no estudo e, em 28,1% delas, a cultura foi positiva em apenas um local (9,7 em IV; 3,9% em PV e 14,5% em RA). associação de dois swabs aumenta a porcentagem de isolamento de *S. agalactiae* em relação ao swab isolado ($p < 0,05$), exceto quando o swab isolado é da região anal. A associação de swabs de três locais de coleta foi estatisticamente superior na detecção de colonização materna por *S. agalactiae* ($p < 0,05$). Os dados obtidos apontam elevada incidência de *S. agalactiae* nas gestantes atendidas no Pré-Natal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, e associação dessa colonização com número de relações sexuais por semana, aborto espontâneo anterior e presença de candidíase ou vaginose citolítica. Somado à esses achados, foi possível concluir ainda que a utilização de três swabs combinados das regiões perianal, parede e intróito vaginais foi significativamente mais eficaz na detecção de colonização por *S. agalactiae*.

Palavras Chave: *Streptococcus agalactiae*; flora vaginal; swabs combinados, fatores de risco, colonização materna.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Durante as últimas décadas, poucos temas na literatura científica obstétrica e pediátrica têm despertado tanto interesse como a colonização materna por *Streptococcus agalactiae* e infecção neonatal de início precoce¹. Essas infecções apresentam alto grau de morbidade e mortalidade, sendo os recém-nascidos prematuros os que apresentam maior risco de infecção por esse microrganismo².

Isolado pela primeira vez em 1887, o *S. agalactiae* foi relatado como patógeno humano no final de 1930³. São cocos gram positivos, colonizadores do ambiente reto-vaginal, que podem ser erradicados em muitas mulheres sem tratamento, mas também podem ser agente etiológico de várias infecções no organismo materno como infecções do trato urinário^{4,5}, endocardite, celulites, sepse⁴ além de comprometer a evolução da gestação, provocando abortamento, coriomnionite^{4,6}, rotura prematura de membranas e parto prematuro com aumento nas taxas de prematuridade⁷.

A resposta imune inata parece ter grande importância na patogênese da infecção estreptocócica. A infecção neonatal de início precoce é acompanhada de uma resposta excessiva de citocinas pró-inflamatórias no sangue do cordão umbilical. Essas citocinas parecem ter um papel importante na defesa do hospedeiro contra o *S. agalactiae*, embora níveis elevados de fator de necrose tumoral (TNF- α) podem, por outro lado, contribuir significativamente para os eventos da fisiopatologia da sepse por *S. agalactiae* e choque séptico^{8,9}.

Segundo a literatura, a frequência de colonização por *S. agalactiae* pode variar de 6,5 a 48%¹⁰⁻¹⁵. Nos estudos realizados no Brasil, a prevalência tem variado de 15 a 21%^{1, 16-18}. Nesse sentido, em estudo recente, Beraldo *et al.*¹ descrevem uma taxa de colonização de 14,9% entre 309 gestantes. Do total de gestantes colonizadas, 56,5% tinham colonização vaginal, 17,4% apresentaram cultura retal positiva e 26,1% ambas

culturas positivas. Para esses autores, é de suma importância que se faça pesquisa de *S. agalactiae* vaginal e retal visando maior taxa de prevalência desse microrganismo. Outros autores¹⁸ são concordantes em mostrar que a combinação de *swabs* vaginal e retal aumentam em 30% o isolamento de *S. agalactiae*, quando comparado ao *swab* vaginal isolado.

Porém, ainda hoje a abordagem de gestantes, com colonização por *S. agalactiae*, é amplamente debatida entre neonatologistas e obstetras, uma vez que cerca de 30% delas podem estar colonizadas por *S. agalactiae* e, na grande maioria, se apresentam assintomáticas. Vários trabalhos¹⁹⁻²¹ têm mostrado que a colonização materna, particularmente em estudos de abordagem quantitativa, é um fator de risco significativo para a aquisição de doença neonatal por *S. agalactiae* e a transmissão da mãe colonizada para o feto pode ocorrer verticalmente após a rotura das membranas ou durante o trabalho de parto²². Para os neonatos, a exposição à esse microrganismo pode ter consequências severas para os sobreviventes^{2,23,24}.

Variações na prevalência da colonização pelo *S. agalactiae*, encontradas na literatura podem ser atribuídas tanto à diferenças nas características das populações como idade, paridade, nível sócio-econômico e localização geográfica, quanto às diferenças nos meios de cultura utilizados²⁵⁻²⁷, sendo que a utilização de meios seletivos contendo antibióticos para inibição do crescimento de outros microrganismos podem aumentar a positividade da cultura em até 50%²⁸.

De acordo com alguns autores a taxa de colonização de gestantes diabéticas é maior quando comparada à de gestantes não diabéticas. Segundo Ramos *et al.*²⁹ 43,8% das gestantes diabéticas foram identificadas como colonizadas por *S. agalactiae* comparado com 22,7% do grupo controle. Ainda segundo esses autores, não houve

diferença na taxa de colonização entre as gestantes diabéticas que utilizavam insulina e naquelas que o diabetes era controlado apenas com dieta.

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) recomenda o rastreamento para todas as gestantes entre 35 e 37 semanas de gestação³⁰. Para aquelas com cultura positiva, a profilaxia é recomendada durante o trabalho de parto reduzindo em até 70% a ocorrência de sepse neonatal³¹.

Ao contrário do que os estudos mais antigos apontavam a respeito de aumento progressivo na quantidade de *Lactobacillus*, com o avançar da idade gestacional³², pesquisas mais recentes têm mostrado que a frequência e quantidade dos mesmos permanecem relativamente constantes nos dois últimos trimestres de gestação³³.

Diversos estudos demonstraram menores taxas de complicações maternas e perinatais nas pacientes com predomínio de *Lactobacillus* em seus esfregaços vaginais corados pelo método de Gram, principalmente no que diz respeito ao trabalho de parto prematuro³⁴⁻³⁶. Acredita-se que essa flora seja uma importante forma de proteção contra a aquisição de infecções do trato genital inferior. Entretanto, a presença de outros microrganismos no meio vaginal é frequente, mesmo em gestantes normais, desde que em concentrações menores que 10^6 UFC/g de conteúdo vaginal. É comum o isolamento de *Klebsiella* spp., difteroides, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Preteus* spp., *Escherichia coli*, *Peptostreptococcus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Em estudo recente, Altoparlak *et al.*³⁷ avaliaram as diferenças na flora vaginal de gestantes colonizadas por *S. agalactiae* e descreveram que 127 cepas de bactérias foram isoladas do conteúdo vaginal dessas mulheres, e as espécies de *Candida*, os microrganismos predominantes. Em relação aos *Lactobacillus*, estes estiveram presentes em 21,3% das gestantes colonizadas por *S. agalactiae* e em 47,6% das não colonizadas.

Alguns estudos relatam taxas mais elevadas de colonização por *S. agalactiae* em pacientes atendidas em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis (DST) do que em outras populações e utilizaram esse argumento para sugerir que o *S. agalactiae* seria de transmissão sexual. Entretanto, outros autores têm descrito argumentos contrários à transmissão sexual do *S. agalactiae*, não sendo possível correlacionar promiscuidade e outras DST e colonização estreptocócica³⁸⁻⁴⁰.

Em trabalho recente Honig et al.⁴⁰ não observaram correlação entre colonização vaginal por *S. agalactiae* e números de parceiros sexuais nos últimos seis meses, no último mês, uso de preservativo e método contraceptivo utilizado. Ainda segundo esses autores, não houve correlação entre colonização por *S. agalactiae* e infecções genitais concomitantes, como candidíase, vaginose bacteriana, e infecções por *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e *Trichomonas vaginalis*, assim como úlceras genitais. Neste estudo, os autores relatam ainda que mulheres colonizadas com *S. agalactiae* não apresentavam mais sinais e sintomas de corrimento vaginal do que as não colonizadas.

Por outro lado, Regan et al.⁴¹ descrevem associação entre colonização vaginal por *S. agalactiae* e alteração da microbiota vaginal. Para Honig et al.⁴⁰ a identificação de fatores de risco específicos para a colonização por *S. agalactiae* requerem estudos futuros.

Considerando as diferenças de prevalência de colonização por *S. agalactiae* nas diferentes populações estudadas e a alta prevalência de infecções genitais durante a gestação, esse trabalho se justifica.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Os objetivos desse estudo foram:

- 5.1. Avaliar a incidência da colonização retovaginal por *S. agalactiae* em gestantes de último trimestre atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu;
- 5.2. Associar a colonização por *S. agalactiae* com o padrão da microbiota vaginal das gestantes;
- 5.3. Avaliar a cultura em *swabs* combinados para detecção de colonização materna por *S. agalactiae*.

PACIENTES E MÉTODOS

3. Pacientes e Métodos

3.1. Casuística

Foi realizado um estudo clínico, prospectivo e transversal, no qual foram incluídas 405 pacientes com gestação única, em idade gestacional variando de 35 a 37 semanas atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

A idade gestacional foi estabelecida pela data da última menstruação e/ou por exame ultra-sonográfico < 20 semanas.

Todas as gestantes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I). Responderam também a um questionário com perguntas para obtenção de dados das gestações atual e anteriores quando pertinente, além da idade, grau de escolaridade, hábito tabagista, número de parceiros sexuais no período de um ano, número de relações sexuais por semana durante a gravidez atual, queixas de corrimento e história de doença sexualmente transmissível atual e anterior (Anexo II).

Foram excluídas do estudo as gestantes com infecção urinária ou que estavam em uso de antibióticos ou anti-fúngicos. As pacientes com menos de 72 horas da última relação sexual foram orientadas e a coleta das amostras foi reagendada.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob protocolo 306/2006 (Anexo III).

3.2. Coleta das amostras

A coleta do material foi realizada apenas em gestantes, que no momento da consulta tinham mais de 72 horas após a última relação sexual e/ou procedimentos vaginais (toque digital, ultrassonografia transvaginal), além de não terem sido submetidas à antibioticoterapia no período de 40 dias.

Utilizando-se zaragatoas estéreis e distintas para cada local, foram obtidas amostras do intróito vaginal (IV), terço distal da parede vaginal (PV) e da região perianal (PA). As amostras coletadas foram introduzidas em tubos estéreis, devidamente identificados, contendo meio de transporte de Amies e permaneceram refrigeradas por, no máximo 3 horas até o processamento para pesquisa de *S. agalactiae*.

Outra zaragatoa foi utilizada para coleta de conteúdo do terço médio da parede vaginal, para realização de esfregaços delgados em lâmina de vidro, que foram utilizadas para realização dos exames a fresco e corado pelo método de Gram, para exame microscópico do conteúdo vaginal.

O isolamento e identificação do *S. agalactiae* foi realizado de acordo com o preconizado pelo CDC e foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp (Figura 1).

3.3. Processamento das amostras coletadas para pesquisa de *S. agalactiae*

As zaragatoas acondicionadas no meio de transporte de Amies foram transferidas para o meio de seletivo de Todd-Hewit suplementado com colistina (10µg/mL) e ácido nalidíxico (15µg/mL) que foi incubado por um período de 18 a 24 horas à temperatura de 37°C.

3.4. Isolamento dos microrganismos

Após o período de incubação do caldo seletivo, foi realizada uma subcultura em placa de ágar-sangue a 5% sob as mesmas condições. Se após um período de 24 horas de incubação sem crescimento de colônias sugestivas de *S. agalactiae*, a subcultura foi reincubada até completar 48 horas.

3.5 Identificação de ***Streptococcus agalactiae***

Aquelas colônias, que na subcultura em ágar-sangue, foram sugestivas de *S. agalactiae* e, portanto, apresentaram uma zona de β -hemólise, foram submetidas a coloração de Gram e ao teste da catalase. Visto que o gênero *S. agalactiae* é composto por cocos gram positivos e catalase negativos, os isolados que apresentaram este perfil foram submetidos ao Camp-Test para identificação da espécie *S. agalactiae*.

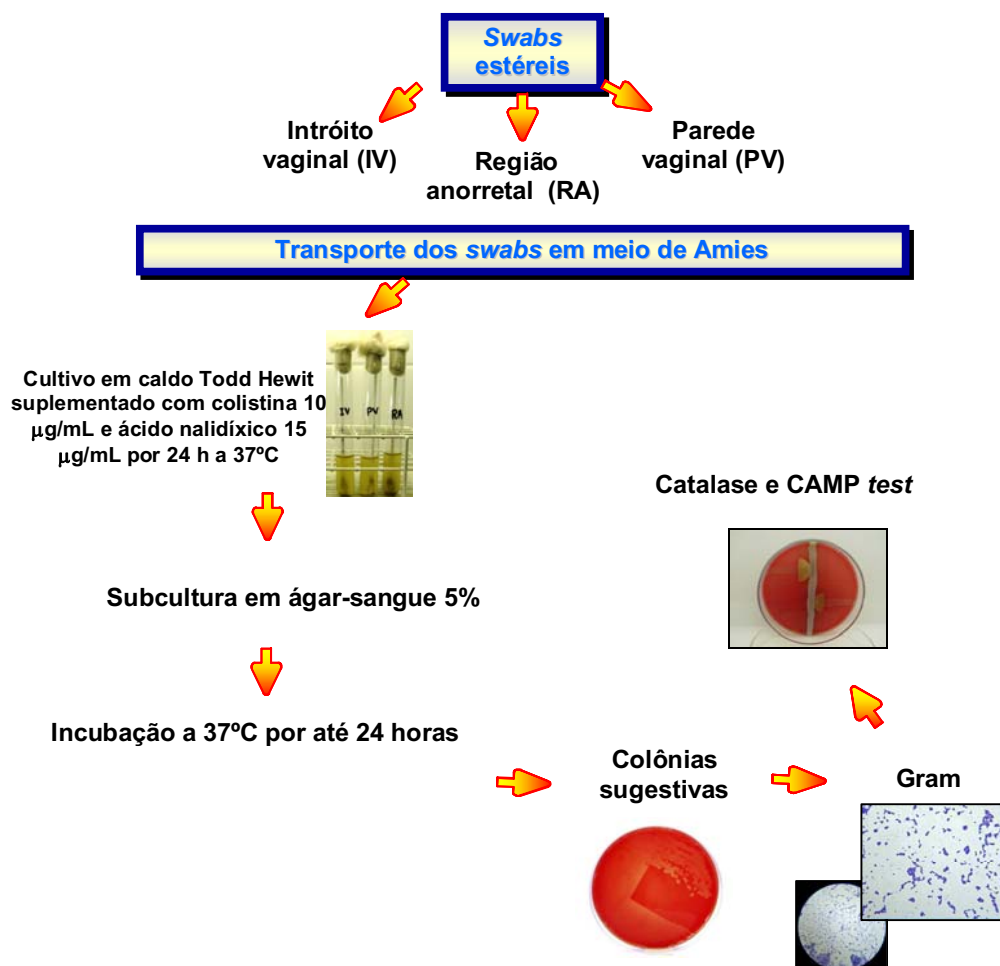


Figura 1. Representação esquemática da metodologia empregada para isolamento e identificação de *S. agalactiae*.

3.6. Exame microscópico do conteúdo vaginal

Logo após a coleta, as lâminas do exame microscópico direto a fresco foram analisadas para a pesquisa de *Trichomonas vaginalis*. As demais lâminas foram encaminhadas ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, para fixação ao calor e coloração pelo método de Gram. Nelas foram observadas a morfologia e coloração específicas dos microrganismos, além de análises semi-quantitativas de leucócitos e células epiteliais, aos quais foram atribuídos de 0 a 4 cruzes, sob análise dos campos microscópicos em imersão (1000 vezes).

3.6.1. Critérios de diagnóstico laboratorial das infecções genitais

3.6.1.1. Flora I

A normalidade da microbiota vaginal foi diagnosticada pela observação de predomínio de *Lactobacillus* no exame microscópico do conteúdo vaginal, corado pelo método de Gram, na ausência ou na presença de raros leucócitos e na ausência de elementos micóticos e de *T. vaginalis*.

3.6.1.2. Candidíase vaginal

A candidíase vaginal foi diagnosticada pela visualização de blastoconídeos e/ou pseudo-hifas no exame microscópico do conteúdo vaginal, no exame a fresco e/ou no esfregaço corado pelo método de Gram.

3.6.1.3. Vaginose bacteriana

O diagnóstico dessa entidade foi feito com base nos critérios estabelecidos por Nugent *et al.*⁴², baseada na morfologia e coloração dos microrganismos observados e suas respectivas quantidades.

3.6.1.4. Flora II

Foram consideradas portadoras desta afecção as gestantes cujo exame microscópico do conteúdo vaginal, corado pelo método de Gram, evidenciaram alterações, tais como células redução da quantidade de bacilos Doderlein $\leq +/4+$ e um misto de morfotipos bacterianos e ausência de agente etiológico específico⁴³.

3.6.1.5. Vaginite aeróbia

O diagnóstico desta condição foi dado pelo exame microscópico do conteúdo vaginal a fresco, segundo critérios descritos por Donders *et al.*⁴⁴.

3.6.1.6. Vaginose citolítica

O diagnóstico desta condição foi descrito pelo exame microscópico do conteúdo vaginal corado pelo método de Gram, quando presentes pelo menos $+++/4+$ de células epiteliais e $++++/4+$ de lactobacilos, tendo-se ausência de elementos micóticos⁴⁵.

3.6.1.7. Infecção por *Trichomonas vaginalis*

A pesquisa do protozoário *T. vaginalis* foi realizada no exame microscópico direto a fresco do conteúdo vaginal.

3.7. Análise Estatística

Considerando como variável resposta a colonização materna ou não por *S. agalactiae*, foi ajustado um modelo de regressão logística adotando o método *stepwise*, considerando as variáveis explanatórias quantitativas: idade materna, escolaridade, número de filhos, número de parceiros sexuais/ano, paridade, número de relações sexuais/semana, e com as variáveis qualitativas: ocorrência de TPP, RPM, aborto espontâneo e DST anteriores e queixa de corrimento e padrão da microbiota vaginal atuais. O *software* empregado foi o SAS versão 9.1 e o nível de significância adotado

foi de 5% para entrada e saída de variáveis no ajuste do modelo de regressão logística pelo método *stepwise*. Para positividade de cultura em *swabs* combinados e isolados foi empregado o teste de Tukey⁴⁶. O *software* empregado foi o Sigma Stat (Jandel Corporation) e o nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Incidência de colonização retovaginal por *S. agalactiae* e características associadas e prevalência de infecções genitais

No período do estudo foram atendidas 567 gestantes, em idade gestacional variando de 35 a 37 semanas, no Serviço de Pré-Natal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Desse total, foram incluídas nesse estudo 405 pacientes, sendo que 106 não puderam fazer parte do estudo por estarem em uso de antibióticos e/ou antifúngicos e 56 por não aceitação do convite para participarem da pesquisa. Do total de gestantes incluídas no estudo, a colonização materna por *S. agalactiae* foi de 25,4% (103/405) (Figura 2). Em relação à microbiota vaginal, a prevalência de infecções do trato genital inferior foi de 45,6% nas gestantes colonizadas por *S. agalactiae* e 42,1% nas gestantes não colonizadas (Tabela 1) e as alterações da microbiota vaginal mais frequentes foram vaginose citolítica (46/405) seguido de vaginose bacteriana (44/405), candidíase (33/405) e Flora II (33/405) (Figura 3).

Os dados relativos às características sócio-demográficas e gestacionais das pacientes incluídas no estudo estão apresentados na Tabela 2. A mediana de idade materna, número de filhos, escolaridade, paridade, número de relações sexuais por semana, queixa de corrimento e presença de RPM e TPP e abortos espontâneos em gestações anteriores assim como presença de DST em gestações anteriores ou na atual não foram estatisticamente diferentes entre os grupos com cultura positiva para *S. agalactiae* e grupo com cultura negativa (Tabela 2).

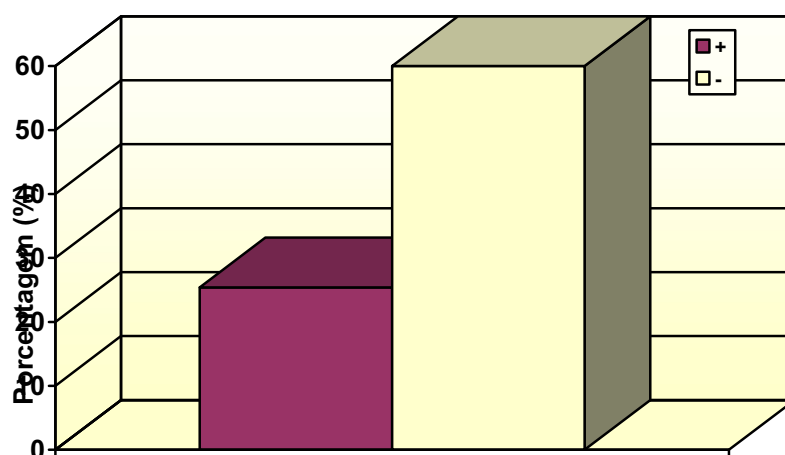


Figura 2. Incidência de colonização retovaginal por *S. agalactiae*, no período do estudo, em gestantes atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Tabela 1. Porcentagem do padrão de microbiota vaginal encontrado nas gestantes com colonização por *S. agalactiae*.

<i>Streptococcus agalactiae</i>	Padrão de microbiota vaginal		Estatística (Teste z)*
	Flora I	Alterada	
Positivo	56 (54,4%)	47 (45,6%)	p=0,31
Negativo	175 (57,9%)	127 (42,1%)	NA

*Teste de comparação de proporções; NA= não avaliado.

Tabela 2. Características sócio-demográficas e gestacionais das 405 pacientes incluídas no estudo em relação a colonização por *S. agalactiae*.

Características sócio-demográficas e gestacionais	<i>Streptococcus agalactiae</i>		p value
	+	-	
1. Idade materna (anos)	26 (21-33)	25 (20-31)	0,05
2. Escolaridade (anos estudados)	9 (6-11)	9 (6-11)	0,85
3. Número de filhos	0 (0-0)	0 (0-0)	0,62
4. Paridade			
Primípara	37/103	142/302	0,07
Secundípara	38/103	85/302	0,11
Multípara	28/103	75/302	0,17
5. NR/S	1 (1-2)	2 (2-3)	0,06
6. Aborto espontâneo*	20/103	84/302	0,09
7. RPM*	8/66	14/160	0,49
8. TPP*	14 /66	32/160	0,94
9. DST*	12/103	21/302	0,17
10. Corrimento	38/103	79/302	0,05

NR/S – número de relações sexuais por semana; RPM – rotura prematura de membranas; TPP – trabalho de parto prematuro; DST – Doença sexualmente transmissível, * em gestações anteriores. Valores expressos em mediana e semi-amplitude inter-quartilica e comparação de proporção entre 2 grupos (Teste z).

Entretanto, ajustando um modelo de regressão logística considerando como variável resposta a colonização materna ou não por *S. agalactiae* e as variáveis explanatórias observadas aplicando um método de ajuste *stepwise*, tem-se que a idade materna, número de relações sexuais/semana, presença de aborto espontâneo e presença de candidíase foram as variáveis que se associaram à essa colonização. A Tabela 3 mostra os valores da estimativa dos parâmetros com seus respectivos erros padrões, a *odds ratio* com o intervalo de confiança de 95% .

Tabela 3. Características sócio-demográficas e gestacionais das 405 pacientes incluídas no estudo em relação a associação com colonização por *S. agalactiae*, ajustado pela regressão logística, no período do estudo realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Variáveis	Estimativa	Erro Padrão	OR	IC 95%	p value
Idade materna	0.0424	0.0197	1.043	(1.004-1.084)	0.03
NR/S	-0.3300	0.1542	0.719	(0.531-0.973)	0.03
AE anterior	0.3142	0.1509	1.875	(1.038-3.387)	0.03
Candidíase	1.1780	0.4161	6.962	(2.193-22.105)	0.005

NR/S=número de relações sexuais por semana; AE anterior=aborto espontâneo anterior.

Aplicando a regressão logística com os padrões de microbiota vaginal, considerando cada padrão isoladamente, obtivemos associação entre presença de colonização materna por *S. agalactiae* e vaginose citolítica (Tabela 4).

Tabela 4. Presença de vaginose citolítica e associação com colonização por *S. agalactiae*, ajustado pela regressão logística para cada padrão de microbiota vaginal, nas pacientes incluídas no estudo.

Variáveis	Estimativa	Erro Padrão	OR	IC 95%	p value
Vaginose citolítica	0.4998	0.2365	2.717	(1.075-6.866)	0.03

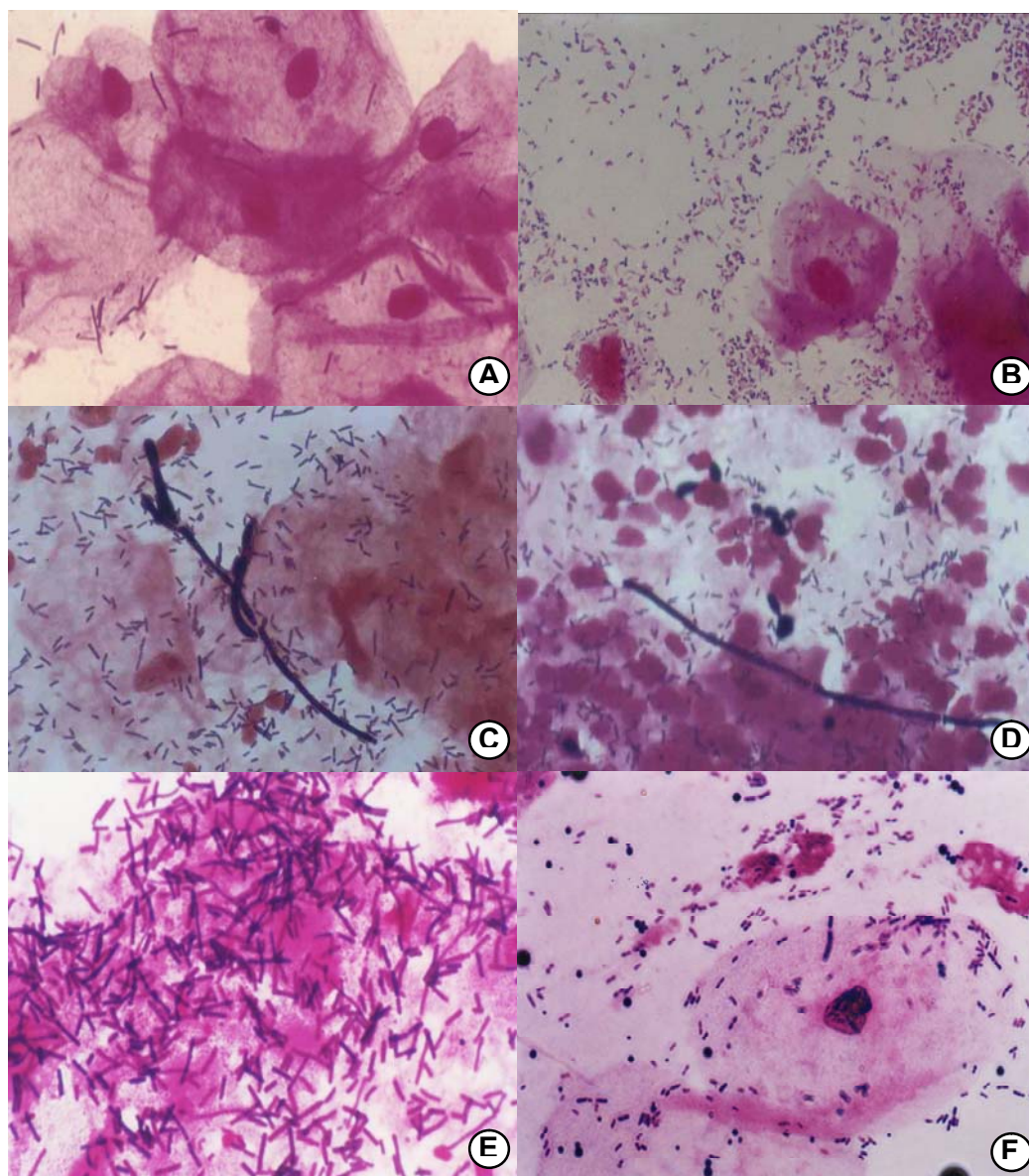


Figura 3. Fotomicrografia dos principais padrões de microbiota vaginal encontradas nas gestantes incluídas no estudo. A) Flora I; B) Vaginose bacteriana; C) e D) Candidíase; E) Vaginose Citolítica e F) Flora II. Coloração de Gram. 1000 x.

4.2. Avaliação de swabs combinados para isolamento de *S. agalactiae*

Considerando o local de coleta, avaliamos a eficácia no isolamento de *S. agalactiae* com *swab* isolado e combinados das regiões IV, PV e PA. Do total de pacientes que apresentaram positividade (103), 14,5% tiveram culturas positivas simultaneamente para IV e PV; 5,8 % para IV e RA e 3,9% para PV e RA. Culturas positivas para os 3 locais de coleta foram observadas em 47,5% das pacientes incluídas no estudo e, em 28,1% delas, a cultura foi positiva em apenas um local (9,7 em IV; 3,9% em PV e 14,5% em RA). A análise estatística do efeito combinado dos locais de coleta mostrou que a associação de 2 swabs aumenta significativamente a porcentagem de isolamento de *S. agalactiae* em relação ao *swab* isolado, exceto quando o *swab* isolado é da região anal. A associação de *swabs* de 3 locais de coleta foi estatisticamente superior na detecção de colonização materna por *S. agalactiae* (Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem de isolamento de *S. agalactiae* nos diferentes locais de coleta: intróito vaginal (IV), parede vaginal (PV) e região anorretal (RA).

Região da coleta	Isolamento de <i>S. agalactiae</i>	
	N (%)	Efeito combinado de locais de coleta N (%)
IV	10 (9,7) ^c	-
PV	4 (3,9) ^c	-
RA	15 (14,5) ^{bc}	-
IV+PV	15 (14,5) ^b	29 (28,1) ^b
IV+RA	6 (5,8) ^b	31 (30,1) ^b
PV+RA	4 (3,9) ^b	23 (22,3) ^b
IV+PV+RA	49 (47,5) ^a	103 (100,0) ^a

Teste de Tukey para comparação de proporções. Na comparação dos grupos foram utilizadas letras minúsculas, considerando-se que as proporções seguidas de, pelo menos, uma mesma letra não diferem.

DISCUSSÃO

5. Discussão

No presente estudo foram rastreadas 405 gestantes e a incidência de colonização por *S. agalactiae* foi de 25,4%. Essa frequência é similar à relatada na literatura, que descreve que taxas de colonização por *S. agalactiae* variando de 5 a 40%^{10-14,47-50}.

A associação entre TPP e RPM e colonização materna por *S. agalactiae* têm sido amplamente discutida na literatura mundial e os resultados são conflitantes. O primeiro relato de associação entre colonização por *S. agalactiae* e RPM e TPP foi descrito, em 1981, por Regan *et al.*⁵¹. Segundo esses autores, a incidência de RPM foi de 8,1% no total de gestantes comparado com 15,3% em gestantes colonizadas a partir de 32 semanas de gestação. Em relação ao TPP, foi de 1,8% comparado com 5,4% das gestantes colonizadas por *S. agalactiae*, associando o aumento de RPM e TPM em pacientes colonizadas. Desde então, vários outros autores têm relatado resultados controversos, alguns demonstrando associação entre colonização e complicação gestacional e outros não descrevendo tal associação⁵²⁻⁵⁵. Para Kubota *et al.*¹¹ nas 615 mulheres incluídas no rastreamento de colonização vaginal por *S. agalactiae* entre a 22ª e 26ª semanas de gestação, a incidência foi de 11,4% e quando essas mesmas pacientes foram submetidas ao rastreamento no momento do parto normal, em trabalho de parto prematuro e com rotura prematura de membranas essa frequência foi de 13,8%. Assim, segundo esses autores, não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências de TPP e RPM entre pacientes colonizadas ou não por *S. agalactiae*.

Não foi objetivo do presente estudo avaliar o desfecho da gestação em gestantes colonizadas por *S. agalactiae*. Entretanto, características sócio-demográficas e gestacionais foram avaliadas e estiveram associadas à colonização por *S. agalactiae*, as variáveis idade materna, número de relações sexuais por semana, presença de aborto espontâneo anterior e presença de candidíase ou vaginose citolítica na gestação atual.

Alguns estudos^{18,50} correlacionam a presença de *S. agalactiae* e variáveis sócio-demográficas estabelecendo a importância da detecção destes fatores. Em relação à idade materna, no presente estudo, a mediana foi de 26 anos no grupo colonizado por *S. agalactiae*. Dados similares foram relatados por Moyo *et al.*⁵⁰, na qual a colonização materna por *S. agalactiae* foi mais comum em mulheres com idade entre 20 e 24 anos. Ainda segundo esses autores, a colonização materna por *S. agalactiae* foi mais comum em mulheres com paridade de 0 a 2 filhos, relação essa que não foi confirmada em nosso estudo.

Pogere *et al.*¹⁸ em estudo com 273 pacientes relataram prevalência de *S. agalactiae* ligeiramente mais elevada em gestantes com idade materna inferior a 20 anos, menor grau de escolaridade e em primíparas, porém sem significância estatística. Nesse mesmo sentido, Borger *et al.*¹⁶ descrevem não haver correlação entre a colonização por *S. agalactiae* e as variáveis idade materna, número de gestações anteriores e presença de aborto anterior. Em contrapartida, no presente estudo, houve associação entre colonização materna por *S. agalactiae* e aborto anterior. A possível participação de *S. agalactiae* em abortos têm sido relatada. Heller *et al.*⁵⁶ avaliando abortos espontâneos do segundo trimestre relataram corioamnionite histológica em 56,7% dos casos e cultura positiva para *S. agalactiae* em 1/3 dos casos com cocos gram positivos notificados pela coloração de Gram.

Em relação ao padrão de microbiota vaginal, no presente estudo, houve associação entre colonização materna por *S. agalactiae* e candidíase ou vaginose citolítica. Já é conhecido que o ecossistema vaginal das gestantes difere pouco do encontrado em não grávidas. Ao contrário dos estudos mais antigos que apontavam aumento progressivo nas quantidades de *Lactobacillus*, com avançar da idade gestacional³², pesquisas mais recentes têm mostrado que sua frequência e quantidade

permanecem relativamente constantes nos dois últimos trimestres de gestação³³. Acredita-se que essa microbiota seja importante forma de proteção contra a aquisição de infecções do trato genital inferior. Estudos evidenciam que o ponto crucial é realmente a produção de água oxigenada (H₂O₂) por determinadas cepas de *Lactobacillus*, capazes ainda de elaborar bacteriocinas que interferem com a aderência bacteriana na célula epitelial vaginal e com a competição por nutrientes, inibindo assim o crescimento exagerado de outros germes comuns no meio vaginal⁵⁷. Entretanto, a presença de outros microrganismos no meio vaginal é freqüente, mesmo em gestantes normais, desde que em concentrações menores que 10⁶ UFC/g de conteúdo vaginal.

A candidíase vaginal isolada não está associada a complicações perinatais relevantes⁵⁸. Ainda merecem estudos os fatores que fazem com que a *Candida* deixe de ser comensal e passe a agredir o hospedeiro. Atualmente acredita-se que as inter-relações imunológicas, entre hospedeiro e fungo, sejam fundamentais para esse entendimento^{59,60}. A gravidez é o fator predisponente mais comum, apesar de ser complexo o mecanismo pelo qual a gestação aumenta a prevalência dessa infecção^{61,62}. O aumento de glicogênio local decorrente dos altos níveis de estrogênios circulantes, além de representar fonte energética para o fungo, contribui para a acidificação do meio vaginal, diminuindo o número de outros microrganismos que seriam inibitórios para a *Candida* sp.⁶³. Além disso, os níveis elevados de progesterona aumentam a virulência do fungo, facilitando a invasão tecidual pela formação de pseudo-hifas.

A associação entre colonização por *S. agalactiae* já foi descrita anteriormente. Segundo Bayo et al.⁶⁴, o *S. agalactiae* foi frequentemente co-isolado com *C. albicans* em 54,5% das 623 grávidas saudáveis em idade gestacional variando de 35 a 40 semanas. Em contrapartida, Honig et al.⁴⁰ não encontraram correlação entre colonização por *S. agalactiae* e candidíase vaginal. Nesse sentido, Kubota et al.⁶⁵ encontraram

prevalência maior de isolados de *C. albicans* em gestantes não colonizadas por *S. agalactiae* em relação às colonizadas, entretanto, o isolamento de *Lactobacillus* foi significativamente inferior no primeiro grupo.

Nesse contexto, na literatura recente, não encontramos outros relatos de associação de colonização por *S. agalactiae* e vaginose citolítica, entretanto a grande casuística incluída nesse estudo reforça a pertinência dessa associação. A vaginose citolítica, apesar de não se tratar caracteristicamente de patologia infecciosa, é condição que freqüentemente é diagnosticada como candidíase vaginal, por apresentar sintomatologia semelhante. Tal sintomatologia seria determinada pela eliminação de substâncias irritativas do citoplasma das células intermediárias, decorrente do processo de citólise por atuação dos lactobacilos⁴⁵. Segundo Cerikcioglu & Beksac⁶⁶, é uma alteração da microbiota vaginal que acomete cerca de 7% das mulheres com sintomas de candidíase recorrente. A alta prevalência de colonização materna por *S. agalactiae* em associação ou não com candidíase ou vaginose citolítica, reforça a necessidade de rastreamento dessa colonização no terceiro trimestre de gestação.

Quanto à avaliação de cultura de *swabs* combinados para avaliação da colonização materna por *S. agalactiae*, observamos maior frequência de isolamento em *swabs* da região anal quando comparado com as regiões do intróito vaginal e parede vaginal e quando associados *swabs* de dois ou três locais de coleta. Nesse sentido, em estudo recente, Beraldo *et al.*¹ descrevem uma taxa de colonização de 14,9% entre 309 gestantes. Do total de gestantes colonizadas, 56,5% tinham colonização vaginal, 17,4% apresentaram cultura retal positiva e 26,1% ambas culturas positivas. Para esses autores, é de suma importância que se faça pesquisa de *S. agalactiae* vaginal e retal visando uma maior taxa de prevalência desse microrganismo. Vários autores^{18,19} são concordantes em

mostrar que a combinação de *swabs* vaginal e retal aumentam em 30% o isolamento de *S. agalactiae*, quando comparado ao *swab* vaginal isolado.

Segundo El-Kersh *et al.*⁶⁷ o *S. agalactiae* foi isolado de pelo menos um local em 66 das 217 pacientes incluídas no estudo. Dos 66 casos, 33 (50%) foram isolados de ambos os *swabs* vaginal e retal. Segundo esses autores, o isolamento de *S. agalactiae* no *swab* vaginal foi de 33% e na retal de 17%. Em concordância com El-Kersh, Moyo *et al.*⁵⁰ descrevem que o *S. agalactiae* foi isolado mais frequentemente da vagina (12,6%) do que do reto (6,3%).

No presente estudo, a região que apresentou isoladamente maior frequência de colonização por *S. agalactiae* foi a região anal e em relação a associação de 2 locais de coletas, combinar *swabs* do intróito vaginal e da região anal apresenta maior detecção de colonização por *S. agalactiae*. Platt *et al.*⁶⁸, em estudo com gestantes, coletaram 870 *swabs* das regiões anal e vaginal e em 651 destas pacientes coletaram outro *swab* da região vaginal. Esses autores encontraram 110 pacientes positivas para *S. agalactiae* dentre os *swabs* coletados nas duas regiões e apenas 35 foram positivas apenas na região vaginal, sugerindo a importância da coleta da região anal, já que o trato gastrointestinal corresponde a fonte preliminar de *S. agalactiae*, e a devida associação entre regiões de coleta. No presente estudo, a associação de três locais de coleta, representadas pela região perianal, parede e intróito vaginais, foi estatisticamente superior na detecção de colonização materna por *S. agalactiae*.

Em conjunto, os dados deste estudo apontam elevada incidência de *S. agalactiae* nas gestantes atendidas no Serviço de Pré-Natal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, e associação dessa colonização com número de relações sexuais por semana, aborto espontâneo anterior e presença de candidíase ou vaginose citolítica. Somado à esses achados, foi possível concluir ainda que a utilização

de 3 *swabs* combinados das regiões perianal, parede e intróito vaginais foi estatisticamente mais eficaz na detecção de colonização materna por *S. agalactiae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências*

1. BERALDO, C. et al. Prevalence of vaginal and anorectal colonization by group β *Streptococcus* in pregnant women in the last three months of gestation. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v.2, p.543-549, 2004.
2. FREITAS, F. et al. **Rotinas em obstetrícia**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
3. FRY, R. Fatal infections by haemolytic *Streptococcus* group B. **Lancet**, v.1, p.199-201, 1938.
4. YANCEY, M.K. et al. Perinatal infection associated with vaginal group B streptococcal colonization. **Obstet. Gynecol.**, v.84, p.816-819, 1994.
5. ZANGWILL, K.M.; SCHUCHAT, A.; WENGER, J.D. Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system. CDC Surveillance Summaries. **MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v.41, p.25-32, 1992.
6. PAEPE, M.E. et al. The histologic fetoplacental inflammatory response in fatal perinatal group β *Streptococcus* infection. **J. Perinatol.**, v.24, p.441-445, 2004.
7. REGAN, J.A. et al. Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.174, p.1354-1360, 1996.
8. BERNER, R. et al. Plasma levels and gene-expression of G-CSF, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and sICAM-1 in neonatal early-onset sepsis. **Pediatr. Res.**, v.44, p.469-477, 1998.
9. TETI, G.; MANCUSO, G.; TOMASELLO, F. Cytokine appearance and effects of antitumor necrosis factor antibodies in a neonatal rat model of group B streptococcal infection. **Infect. Immunol.**, v.61, p.227-232, 1993.
10. HEELAN, J.S. et al. Evaluation of a new selective enrichment broth for detection of group B streptococci in pregnant women. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.896-897, 2005.
11. KUBOTA, T. Relationship between maternal group B streptococcal colonization and pregnancy outcome. **Obstet. Gynecol.**, v.92, p.926-930, 1998.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 2001. 240p.

12. RALLU, F. et al. Sensitivities of antigen detection and PCR assays greatly increased compared to that of the standard culture method for screening for group B *Streptococcus* carriage in pregnant women. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.725-728, 2006.
13. ANDERSON, B.; SIMHAN, H.; SIMONS, K. Additional antibiotic use is associated with preterm birth among women with GBS bacteriuria. **SMFM Abstr.**, p.40, 2006.
14. YÜCESOY, G. et al. Maternal colonisation with group B streptococcus and effectiveness of a culture-based protocol to prevent early-onset neonatal sepsis. **Int. J. Clin. Pract.**, v.58, p.735-739, 2004.
15. KIERAN, E. et al. Group B *Streptococcus* (GBS) colonisation among expectant Irish mothers. **Ir. Med. J.**, v.91, p.21-22, 1998.
16. BORGER, I.L. et al. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v.27, p.575-579, 2005.
17. NASCIMENTO, D.J. Profilaxia de transmissão vertical do GBS (Streptococo Beta Hemolítico): quando e como tratar. **Rev. SOGIPA**, v.22, p.5, 2002.
18. POGERE, A. et al. Prevalência da colonização pelo estreptococo do grupo B em gestantes atendidas em ambulatório de pré-natal. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v.27, p.174-180, 2005.
19. GERARDS, L.J.; CATS, B.P.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J.A. Early neonatal group B streptococcal disease: degree of colonisation as an important determinant. **J. Infect.**, v.11, p.119-124, 2005.
20. MORALES, W.J.; LIM, D.V.; WALSH, A.F. Prevention of neonatal group B streptococcal sepsis by the use of a rapid screening test and selective intrapartum chemoprophylaxis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.155, p.979-983, 1986.
21. TUPPURAINEN, N.; HALLMAN, M. Prevention of neonatal group B streptococcal disease: intrapartum detection and chemoprophylaxis of heavily colonized parturients. **Obstet. Gynecol.**, v.73, p.583-587, 1989.
22. BAKER, C.; EDWARDS, M. Group B streptococcal infections. In: REMINGTON, J.S.; KEIN, J.O. **Infectious diseases of the fetus and the newborn infant**. 4.ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995. p.980-1054.

23. GRASSI, M.S.; DINIZ, E.M.A.; VAZ, F.A.C. Métodos laboratoriais para diagnóstico da infecção neonatal precoce pelo *Streptococcus* beta hemolítico do grupo B. **Pediatria**, v.23, p.232-240, 2001.
24. COLE, D.; BERNSTEIN, P.S. **Na update on perinatal group B streptococcal disease.** OB/Gyn Women's Health, 2002. Disponível em: <<http://www.medscape.com>>. Acesso em: 27/02/2006.
25. RAUEN, N.C.; WESENBERG, E.M.; CARTWRIGHT, C.P. Comparioson of selective and nonselective enrichment broth media for the detection of vaginal and anorectal colonization with group B streptococcus. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.51, p.9-12, 2005.
26. GUPTA, C.; BRISKI, L.E. Comparison of two culture media and threee sampling techniques for sensitive and rapid screening of vaginal colonization by group B streptococcus in pregnant women. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.3975-3977, 2004.
27. RÉGLIER-POUPET, H. et al. Prospective evaluation of a real-time PCR assay for detection of group B streptococci in vaginal swabs from pregnant women. **Eur. J. Clin. Infect. Dis.**, v.24, p.355-357, 2005.
28. ORSELLO, C.; DOMMERMUTH, R. Maximizing neonatal early onset group B streptococcal disease prevention with universal culture screening al 35 to 37 weeks: A comparison of GBS detection rates between LIM broth and CAN culture media. **Farm. Med.**, v.35, p.411-413, 2003.
29. RAMOS, E. et al. Group B streptococcus colonization in pregnant diabetic women. **Obstet. Gynecol.**, v.89, p.257-260, 1997.
30. PREVENTION of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. Centers for Disease Control and Prevention. **MMWR. Recomm. Rep.**, v.45, p.1-24, 1996.
31. BALTIMORE, R.S. Consequences of prophylaxis for group B streptococcal infections of the neonate. **Elsevier**, v.31, p.33-38, 2007.
32. GOPLERUD, C.P.; OHM, M.J.; GALASK, R.P. Aerobic and anaerobic flora of the cervix during pregnancy and the puerperium. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.126 p.858-68, 1976.
33. ESCHENBACH, D.A. et al. Prevalence of hydrogen peroxide *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. **J. Clin. Microbiol.** , v.27, p.251-256, 1989.
34. NAGY, E.; PETTERSON, L.; MARDH, P.A. Antibiosis between bacteria isolated from the vagina of women with and without signs of bacterial vaginosis. **APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v.99, p.739-744, 1991.

35. HILLIER, S.L. et al. The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. **Obstet. Gynecol.**, v.79, p.369-373, 1992.
36. HILLIER, S.L. et al. The normal vaginal flora H₂O₂-producing lactobacilli and bacterial vaginosis in pregnant women. **Clin. Infect. Dis.**, v.16, p.273-281, 1993.
37. ALTOPARLACK, U.; KADANALI, A.; KADANALI, S. Genital flora in pregnancy and its association with group B streptococcal colonization. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, v.87, p.245-246, 2004.
38. BAKER, C.J. et al. Vaginal colonization with group B streptococcus: a study in college women. **J. Infect. Dis.**, v.135, p.392-397, 1977.
39. WALLIN, J.; FORSGEN, A. Group B streptococci in venereal disease clinic patients. **Br. J. Vener. Dis.**, v.51, p.401-404, 1975.
40. HONIG, E.; MOUTON, J.W.; VAN DER MEIJDEN, W.I. The epidemiology of vaginal colonization with group B streptococci in a sexually transmitted disease clinic. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.105, p.177-180, 2002.
41. REGAN, J.A.; KLEBANOFF, M.A.; NUGENT, R.P. The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. **Obstet. Gynecol.**, v.77, p.604-610, 2002.
42. NUGENT, R.P.; KROHN, M.A.; HILLIER, S.L. Reability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, p.297-301, 1991.
43. LARSSON, P.G. et al. Diagnosis of bacteial vaginosis: need for validation of microscopic image area used for scoring bacterial morphotypes. **Sex. Transm. Infect.**, v.80, p.63-67, 2004.
44. DONDERS, G.G. et al. Aerobic vaginitis: abnormal vaginal flora entity that is distinct from bacterial vaginosis. **Int. Congr. Ser.**, v.1279, p.118-129, 2005.
45. CIBLEY, L.J.; CIBLEY, L.J. Cytolytic vaginosis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.165, p.1245-1249, 1991.
46. ZAR, J.H. **Bioestatistical analysis**. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999.

47. DAIMARU-ENOKI, L.C. et al. First-trimester group B *Streptococcus* colonization of the cervix: a risk factor for maternal colonization at term? **J. Reprod. Med.**, v.50, p.496-500, 2005.
48. BENEDETTO, C. et al. Cervico vaginal infections during pregnancy: epidemiological and microbiological aspects. **J. Matern. Fetal. Neonat. Med.**, v.16, p.9-12, 2004.
49. ORRET, F.A. Colonization with Group B streptococci in pregnancy and outcome of infected neonates in Trinidad. **Pediatr. Int.**, v.45, p.319-323, 2003.
50. MOYO, S.R. et al. Prevalence, capsular type distribution, anthropometric and obstetric factors of group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*) colonization in pregnancy. **Cent. Afr. J. Med.**, v.46, p.115-120, 2005.
51. REGAN, J.A.; CHO, S.; JAMES, L.S. Premature rupture of membranes, preterm delivery, and group B streptococcal colonization of mothers. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.141, p.184-186, 1981.
52. HASTINGS, M.J. et al. Group B streptococcal colonization and outcome of pregnancy. **J. Infect.**, v.12, p.23-29, 1986.
53. DASKALAKIS, G. et al. Bacterial vaginosis and group B streptococcal colonization and preterm delivery in a low-risk population. **Fetal. Diag. Ther.**, v.21, p.172-176, 2006.
54. AL-SWEIH, N. et al. *Streptococcus agalactiae* (Group B *Streptococci*) carriage in late pregnancy in Kuwait. **Med. Princ. Pract.**, v.13, p.10-14, 2004.
55. GARLAND, S.M.; KELLY, N.; UGONI, A.M. Is Antenatal Group B Streptococcal Carriage a Predictor of Adverse Obstetric Outcome? **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v.8, p.138-142, 2000.
56. HELLER, D.S. et al. Second-trimester pregnancy loss at an urban hospital. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v.11, p.117-122, 2003.
57. SERVIN, A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.28, p.405-440, 2004.
58. COTCH, M.F. et al. Epidemiology and outcomes associated with moderate to heavy *Candida* colonization during pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.178, p.374-380, 1998.

59. WITKIN, S.S.; HIRSCH, J.; LEDGER, W.J. A macrophage defect in women with recurrent *Candida* vaginitis and its reversal *in vitro* by prostaglandin inhibitors. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.155, p.790-795, 1986.
60. WITKIN, S.S. IgE antibodies to *Candida albicans* in vaginal fluids of women with recurrent vaginitis. In: MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF MICROBIOLOGISTS, 1987, Palm Springs. **Proceedings...** Palm Springs, 1987. p.10.
61. POWELL, B.L.; FREY, C.L.; DRUTZ, D.J. Identification of 173-estradiol-binding protein in *Candida albicans* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. **Exp. Mycol.**, v.8, p.304-313, 1984.
62. MADANI, N.D. et al. *Candida albicans* estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, p.922-926, 1994.
63. DOUGLAS, L. J.; HOUSTON, J. G.; MCCOURTIE, J. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after-growth on different carbon sources. **Infect. Immun.**, v.32, p.1234-1241, 1981.
64. BAYO, M.; BERLANGA, M.; AGUT, M. Vaginal microbiota in healthy pregnant women and prenatal screening of group B streptococci (GBS). **Int. Microbiol.**, v. 5, p.87-90, 2002.
65. KUBOTA, T.; NOJIMA, M.; ITOH, S. Vaginal bacterial flora of pregnant women colonized with group B streptococcus. **J. Infect. Chemother.** v.8, p.326-330, 2002.
66. CERIKCIOGLU, N.; BEKSAC, M.S. Cytolytic vaginosis: misdiagnosed as candidal vaginitis. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v.12, p.13-16, 2004.
67. EL-KERSH, T.A. et al. Detection of genital colonization of group B streptococci during late pregnancy. **Saudi Med. J.**, v.23, p.56-61, 2002.
68. PLATT, M.W. et al. Increased recovery of group B Streptococcus by the inclusion of rectal culturing and enrichment. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.21, p.65-68, 1995.

ANEXOS

ANEXO I- TERMO DE CONSENTIMENTO



UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA

Distrito de Rubião Júnior, s/nº - Caixa Postal 564 - CEP 18.618-000 - Botucatu - SP - Brasil
☎(014) 3811-6238 - Ramais 6146/6042/6238 - Fax (014) 3811-2348

FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, após ser devidamente esclarecida, aceito participar do projeto de pesquisa intitulado “**INCIDÊNCIA DE COLONIZAÇÃO RETOVAGINAL POR *Streptococcus agalactiae* EM GESTANTES E AVALIAÇÃO DE CULTURA DE SWABS COMBINADOS**”, podendo a qualquer momento esclarecer dúvidas e desistir de participar do mesmo, sem prejuízo do atendimento que necessitar.

Fui informada que, no momento da minha consulta nas Unidades Básicas e de Saúde da Família, Município de Botucatu, serão colhidos material do intróito vaginal e da região perianal, de acordo com as técnicas de rotina padronizadas nos serviços, com o objetivo de se conhecer a prevalência de colonização retovaginal por *Streptococcus agalactiae* em gestantes normais, atendidas nos referidos serviços. Também fui informada que meu nome não aparecerá quando os resultados forem divulgados.

Botucatu, de de 2008.

Assinatura do Paciente:

Assinatura do Pesquisador

Pesquisador: Talita Trevizani Rocchetti

Endereço do Pesquisador: Rua Benedito Franco de Camargo, 35
Vila dos Médicos, Botucatu, SP CEP 18607- 051
Telefone (14) 3882 42 77

Orientador: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Endereço: Rua Izidoro Bertaglia, 746 – Jardim Chácara dos Pinheiros, Cep 18610-140
Telefone (14) 3815 2417

ANEXO II- INSTRUMENTO DE COLETA

UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU



Distrito de Rubião Júnior, s/nº - Caixa Postal 564 - CEP 18.618-000 - Botucatu - SP - Brasil
☎ (014) 3811-6238 - Ramais 6146/6042/6238 - Fax (014) 3811-2348

**INCIDÊNCIA DE COLONIZAÇÃO RETOVAGINAL POR *Streptococcus agalactiae* EM
GESTANTES E AVALIAÇÃO DE CULTURA DE SWABS**

Nome: _____ RG _____

Idade: _____ Clínica: _____ Última RS ____/____/____

Idade Gestacional _____ Data do Atendimento ____/____/____

Escolaridade	_____ anos		
Fumante	☐ Não	☐ Sim	Quantos/dia _____
Paridade	☐ Nulípara	☐ Primípara	☐ Multípara
Aborto espontâneo pregresso	☐ Sim	☐ Não	
RPM pregresso	☐ Sim	☐ Não	
TPP pregresso	☐ Sim	☐ Não	
Nº Parceiros/ano	_____		
Nº relações sexuais/semana	☐ 1	☐ 2	☐ 3 ou mais
DST prévia	☐ Sim	☐ Não	
Queixa de corrimento	☐ Sim	☐ Não	

Exame Microscópico Direto do Conteúdo Vaginal (GRAM):

Pesquisa de *Streptococcus agalactiae*

☐ Positiva

☐ Negativa

Data ____/____/____

Responsável:

Talita Trevizani Rocchetti

Orientador:

Márcia Guimarães da Silva

ANEXO III – ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 03 de julho de 2.006

OF.306/2006-CEP

*Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Márcia Guimarães da Silva
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu*

Prezada Drª Márcia,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto: "Incidência de colonização retovaginal por Streptococcus agalactiae e associação com a microbiota vaginal em gestantes atendidas no HC-FMB-UNESP" a ser conduzido por Talita Trevizani Rocchetti, orientada por Vossa Senhoria, com a participação das Profªs Drªs. Vera Lúcia Moraes Rall, Vera Therezinha Medeiros Borges e da Pós graduanda Camila Marconi, receberam do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 03 de julho de 2.006.

Situação do Projeto: APROVADO.

Ao término deste projeto, apresentar ao CEP Relatório Final de Atividades.

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

ARTIGOS PUBLICADOS

Group B streptococci colonization in pregnant women: risk factors and evaluation of the vaginal flora

Talita T.Rocchetti¹, Camila Marconi¹, Vera L.M.Rall², Vera T.M.Borges³, José E.Corrente⁴, Márcia G. da Silva¹✉

1. Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.
2. Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.
3. Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.
4. Department of Biostatistics, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

✉ Corresponding author

Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University.

Distrito de Rubião Júnior. Zip code: 18618-970 Botucatu, São Paulo, Brazil.

Telefone +55 14 3811 6238/ Fax +55 14 3815 2348

E-mail: mgsilva@fmb.unesp.br

Keywords: Group B streptococci, gestation, vaginal flora, Gram stain, risk factors.

Abstract

Objective: To determine the incidence of group B streptococci (GBS) in our population, and to assess the association between risk factors and vaginal flora with maternal rectovaginal colonization. Method: Samples were obtained from 405 patients with gestational age between 35 and 37 weeks. Swabbing from the vaginal and perianal regions were cultured in Todd Hewitt and subcultured in blood-agar. Colonies suggestive of GBS were submitted to catalase and CAMP test. The vaginal flora was evaluated on Gram stain vaginal smears. Socio-demographic and obstetric data were obtained by designed form. Considering maternal GBS colonization presence or absence as the response variable, a logistic regression model was fitted by the stepwise method with quantitative and qualitative explanatory variables. Results: The incidence of GBS colonization was 25.4%. The most frequent vaginal flora abnormalities was cytolytic vaginosis (11.3%), followed by bacterial vaginosis (10.9%), candidiasis (8.2%) and Flora II (8.1%). Logistic regression analysis revealed that maternal age, number of sexual intercourse/week, occurrence of previous spontaneous abortion, presence of candidiasis and cytolytic vaginosis were associated with streptococcal colonization. Conclusion: The incidence of GBS was high and associated with sexual intercourse frequency, previous spontaneous abortion, and the presence of candidiasis or cytolytic vaginosis.

Introduction

During the last decades, neonatal Group B streptococcal (GBS) disease has been associated with significant rates of morbidity and mortality in the perinatal period [1]. GBS is the leading cause of early neonatal sepsis [2]. Maternal streptococcal colonization is also associated with increased risk for urinary tract infection and pregnancy complications, such as endometritis [3] and chorioamnionitis [3,4], premature delivery and intrauterine death [5]. The main source of neonatal infection is maternal genital tract colonization [6]. GBS is transmitted vertically during labor and delivery, and occurs in up to 80% of neonates born to colonized mothers [7].

The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) currently recommend screening all pregnant women for *S. agalactiae* between 35 and 37 weeks of gestation [8]. For those with rectovaginal GBS positive cultures, intravenous penicillin prophylaxis during labor is recommended as a 70% reduction in neonatal early-onset sepsis has been observed since this strategy was implemented [9].

According to the literature, between 6.5% [10] and 43.6% [11] of pregnant women are colonized by *S. agalactiae* in the vagina or rectum. Maternal colonization rate may vary with population characteristics such as age, parity, socio-economic status, geographic location [12], presence of venereal disease [13], and sexual behavior [14]. Differences in colonization rates can be attributed to variation in the culture methods employed, including the selective media and collection sites used [15].

Another important factor associated with pregnancy outcome is the vaginal flora pattern [16]. Lower rates of maternal and perinatal complications are associated with *Lactobacillus* predominance in the vaginal flora which plays a key role in protecting the genital tract against infections [17].

Previous studies have demonstrated that vaginal flora composition differs between GBS-positive and GBS-negative women. Women with GBS colonization show a lactobacilli-reduced flora [18,19] and greater *Candida* species isolation [19].

Considering the varying rates of maternal GBS colonization in different populations, and the high prevalence of genital tract infections during pregnancy, the purpose of this study was to evaluate GBS incidence in our population and its relationship with risk factors and the vaginal flora.

Materials and methods

This prospective study was conducted at Botucatu Medical School. Samples were obtained from 405 women with gestational age between 35 and 37 weeks with a singleton pregnancy.

Exclusion criteria were refusal to participate, symptoms of urinary infection or antibiotic use within the preceding 60 days, and sexual intercourse within 72 hours before examination. The study was approved by the institutional Ethics Review Board, and written informed consent was obtained from all patients. Gynecological and socio-economic data, as well as information on previous gestations were obtained with a form specifically designed for the study.

For the assessment of GBS status, samples were collected from the vaginal introitus (VI), upper lateral vaginal vault (LV), and perianal region (PR) using different sterile swabs. Samples were inoculated into nonnutritive Amies transport medium and were transported to the microbiology research laboratory. Swabs were removed from the transport medium and inoculated into Todd-Hewitt broth supplemented with colistin (10 µg/mL) and nalidixic acid (15 µg/mL). The inoculated selective broth was incubated

for 24 hours at 37°C. The broth was subcultured on sheep blood Columbia agar base under the same incubation conditions. Colonies suggestive of *S. agalactiae* by a narrow zone of beta-hemolytic colonies were submitted to catalase and CAMP test. Negative subculture plates were reincubated for another 18 to 24 hours and reexamined.

Another swab was collected from the mid-third of the vaginal wall for flora evaluation. Gram-stained slides were evaluated and graded to determine the vaginal flora pattern according to Nugent's criteria.

Considering the presence or absence of maternal GBS colonization as the response variable, a logistic regression model was fitted by the stepwise method with quantitative and qualitative explanatory variables. Statistical analyses were performed with the SAS software, version 9.1. Significance level was set at $p < 0.05$.

Results

During the study period, 567 patients with gestational age between 35 and 37 weeks were seen at the Prenatal Service of Botucatu Medical School. A total of 162 patients were excluded; 106 of them were receiving antibiotics and the other 56 refused to participate in the study. Among the 405 women included in the study, maternal *Streptococcus agalactiae* colonization rate was 25.4%.

The prevalence of genital tract infection was 45.6% in GBS-positive women and 42.1% in those with a negative culture. The vaginal flora abnormalities most frequently observed in the study population were cytolytic vaginosis (11.3%), bacterial vaginosis (10.9%), candidiasis (8.2%) and Flora II (8.1%).

Socio-demographic and gestational data are shown in Table 1. Median maternal age, parity, schooling level, frequency of sexual intercourse, discharge, premature labor,

rupture of membranes, previous abortions, and sexually transmitted diseases did not differ between GBS-positive and GBS-negative women.

Logistic regression analysis showed that maternal age, number of sexual intercourse/week, occurrence of previous spontaneous abortion, presence of candidiasis and cytolytic vaginosis were associated with GBS colonization. OD values for all variables associated with GBS colonization are shown in Table 2.

Discussion

In this study, the incidence of maternal *Streptococcus agalactiae* colonization observed in 405 women was similar to that reported in the literature [18-20]. Given that culture accuracy can be increased depending on the anatomic sites of collection and the microbiologic methods used, *S. agalactiae* detection was performed in accordance to CDC recommendations [21].

There is evidence that GBS colonization varies according to the socio-economic characteristics of the population studied. In this study, mean age was lower in GBS-positive women than in the GBS-negative group, in agreement with others who found higher rates in younger women [22,23]. GBS colonization also seems to correlate with sexual behavior. The rate of positive GBS cultures is reported to be higher in women who have sexual intercourse more frequently [24]. This finding was confirmed by our results. Moreover, GBS has been demonstrated to play a leading role in spontaneous abortion [25]. The fact that the women with GBS colonization in previous gestations are more likely to be colonized in subsequent gestations [26] may explain the association between GBS isolation and previous spontaneous abortion found here.

Our data on genital infection indicate a high percentage of abnormal vaginal flora in the third-trimester of gestation. The importance of this finding lies on the fact

that pregnant women with abnormal genital tract flora diagnosed on Gram stain of vaginal smears are at increased risk of poor gestational outcome [27].

Vaginal flora composition in pregnant women with GBS colonization correlates inversely with lactobacilli counts [18,19] and directly with *Candida* species isolation [19]. In this study, Gram smear examination showed that GBS colonization was associated with candidiasis and cytolytic vaginosis. On the other hand, Honig et al. [28] observed no correlation between GBS positive cultures and genital tract infections, such as bacterial vaginosis, candidiasis, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* and *Trichomonas vaginalis* co-infection.

Considering that the rates of *Candida* species isolation are higher in women with GBS-positive vaginal flora, development into vulvovaginal candidiasis, is more likely to occur among them.

No previous work has assessed the association between cytolytic vaginosis and GBS colonization. However, the large number of subjects included in this study allows the establishment of this association. Although cytolytic vaginosis is not considered to be an infectious pathology of the genital tract, it is commonly misdiagnosed as vaginal candidiasis due to the similarity of symptoms. The symptoms of cytolytic vaginosis are caused by the release of irritant cytoplasmic components which result from lactobacilli overgrowth [29].

In brief, our results show that the incidence of maternal GBS colonization in the study population was high, and associated with sexual intercourse frequency, previous spontaneous abortion, and the presence of candidiasis or cytolytic vaginosis.

Acknowledgments

The authors are thankful to Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for providing financial support to this work (grant 06/55307-0 and 07/51704-7).

References

1. [Schrag SJ](#), [Zywicki S](#), [Farley MM](#), et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *The New England Journal of Medicine*. 2000;342(1):15-20.
2. Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998;11(3):497-513.
3. Winn HN. Group B Streptococcus Infection in Pregnancy. *Clinics in Perinatology*. 2007;34(3):387-392.
4. Yancey MK, Duff P, Clark P, Kurtzer T, Frentzen BH, Kubilis P. Iliac infection in adults: results from a Canadian, population-based, active laboratory surveillance study-1996. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000;182(1):168-173.
6. Boyer KM, Gotoff SP. Strategies for chemoprophylaxis of GBS early-onset infections. *Antibiotics and Chemotherapy*. 1985;35:267-280.
7. Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in newborns: a global perspective on prevention. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 1995;49(1):19-25.
8. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. Centers for Disease Control and Prevention. *Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports*. 1996;45(RR-7):1-24.
9. Baltimore RS. Consequences of prophylaxis for group B streptococcal infections of the neonate. *Seminars in Perinatology*. 2007;31(1):33-38.

10. [Yücesoy G](#), [Calışkan E](#), [Karadenizli A](#), et al. Maternal colonisation with group B streptococcus and effectiveness of a culture-based protocol to prevent early-onset neonatal sepsis. *International Journal of Clinical Practice*. 2004;58(8):735-739.
11. Gavino M, Wang E. A comparison of a new rapid real-time polymerase chain reaction system to traditional culture in determining group B streptococcus colonization. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2007;197(4):388.e1-4.
12. Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP. The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. [Obstetrics and Gynecology](#). 1991;77(4):604-610.
13. Persson K, Bjerre B, Hansson H, Forsgren A. Several factors influencing the colonization of group B streptococci--rectum probably the main reservoir. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 1981;13(3):171-175.
14. Foxman B, Gillespie BW, Manning SD, Marrs CF. Risk factors for group B streptococcal colonization: potential for different transmission systems by capsular type. *Annals of Epidemiology*. 2007;17(11):854-862.
15. Davies HD, Adair CE, Partlow ES, Sauve R, Low DE, McGeer. Two-year survey of Alberta laboratories processing of antenatal group B streptococcal (GBS) screening specimens: implications for GBS screening programs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 1999;35(3):169-176.
16. Romero R, Chaiworapongsa T, Kuivaniemi H, Tromp G. Bacterial vaginosis, the inflammatory response and the risk of preterm birth: a role for genetic epidemiology in the prevention of preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004;190(6):1509-1519.

17. Hillier SL, Krohn MA, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. *Obstetrics and Gynecology*. 1992;79(3):369-373.
18. Kubota T. Relationship between maternal group B streptococcal colonization and pregnancy outcome. *Obstetrics and Gynecology*. 1998;92(6):926-930.
19. Altoparlack U, Kadanali A, Kadanali S. Genital flora in pregnancy and its association with group B streptococcal colonization. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*. 2004;87(3):245-256.
20. Heelan JS, Struminsky J, Lauro P, Sung CJ. Evaluation of a new selective enrichment broth for detection of group B streptococci in pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(2):896-897.
21. Schrag S, GorwitzPR, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group b streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports*. 2002;16(RR-11):1-22.
22. 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. *The Central African Journal of Medicine*. 2000;46(5):115-120.
23. Kadanali A, Altoparlak U, Kadanali S. Maternal carriage and neonatal colonisation of group B streptococcus in eastern Turkey: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance. *International Journal of Clinical Practice*. 2005;59(4):437-440.
24. Foxman B, Gillespie BW, Manning SD, Marrs CF. Risk factors for group B streptococcal colonization: Potential for different transmission systems by capsular type. *Annals of Epidemiology*. 2007;17(11):854-862.

25. McDonald HM, Chambers HM. Intrauterine infection and spontaneous midgestation abortion: Is the spectrum of microorganisms similar to that in preterm labor? *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2000;8(5-6):220-227.
26. Turrentine M, Ramirez M. Prevalence of group b streptococci (GBS) colonization in subsequent pregnancies. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2007;10:S69.
27. Klein LL, Gibbs RS. Infection and preterm birth. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2005;32(3):397-410.
28. Honig E, Mouton JW, Van der Meijden WI. The epidemiology of vaginal colonisation with group B streptococci in a sexually transmitted disease clinic. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*. 2002;105(2):177-180.
29. Cibley LJ, Cibley LJ. Cytolytic vaginosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1991;165(4 Pt 2):1245-1249.

Table 1. Gestational and socio-demographic characteristics of the subjects according to GBS colonization status.

Gestational and socio-demographic variables	<i>Streptococcus agalactiae</i>		<i>p</i> value
	Positive	Negative	
1. Age (years)	26 (21-33)	25 (20-31)	0,05
2. Years of schooling	9 (6-11)	9 (6-11)	0,85
3. Parity			
Nulliparity	37/103	142/302	0,07
Multiparity (II)	38/103	85/302	0,11
Multiparity ($\geq$ III)	28/103	75/302	0,17
4. Sexual intercourse/week	1 (1-2)	2 (2-3)	0,06
5. Spontaneous abortion	20/103	84/302	0,09
6. Premature rupture of membranes*	8/66	14/160	0,49
7. Premature labor*	14 /66	32/160	0,94
8. STD*	12/103	21/302	0,17
9. Vaginal discharge	38/103	79/302	0,05

STD – Sexually transmitted diseases

* Previous gestation. Values are expressed as mean and interquartile range. Z-test proportion comparison.

Table 2. Logistic regression analysis of the gestational and socio-demographic characteristics associated with GBS colonization.

Variable	Estimation	SE	OD	95% CI	<i>p</i> value
Age	0.0424	0.0197	1.043	(1.004-1.084)	0.03
Sexual intercourse/week	-0.3300	0.1542	0.719	(0.531-0.973)	0.03
Spontaneous abortion	0.3142	0.1509	1.875	(1.038-3.387)	0.03
Candidiasis	1.1780	0.4161	6.962	(2.193-22.105)	0.005
Cytolytic vaginosis	0.4998	0.2365	2.717	(1.075-6.866)	0.03

SE= Standard error; OD= Odds ratio; CI=Confidence interval.

Combined swab culture efficacy for detecting *Streptococcus agalactiae* in pregnant women.

Eficácia da cultura de *swabs* combinados para detecção de *Streptococcus agalactiae* em gestantes

Original article

Camila Marconi¹, Talita Trevizani Rocchetti², Vera Lúcia Mores Rall³, Lidia Raquel de Carvalho⁴, Vera Terezinha Medeiros Borges⁵, Márcia Guimarães da Silva⁶ 

¹ Graduate student of Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

² Academic student of Biosciences Institute, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

³ Ph.D. Assistant Professor of the Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

⁴ Ph.D. Assistant Professor of the Department of Biostatistics, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

⁵ Ph.D. Assistant Professor of the Department of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

⁶ Ph.D. Assistant Professor of the Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

This study was conducted at Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil and Microbiology laboratory of the Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

 Corresponding author

Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University,

Distrito de Rubião Júnior, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Telephone: +55 (14) 3811-6238 Fax: +55 (14) 3815-2348

E-mail: mgsilva@fmb.unesp.br

Financial support: FAPESP grants 06/55307-0 and 07/51704-7.

Resumo

Contexto e objetivo: A colonização materna por *Streptococcus agalactiae* e a sepse neonatal de início precoce têm despertado interesse na literatura mundial.. A doença estreptocócica neonatal está associada com significantes índices de morbidade e mortalidade perinatal, principalmente nos recém-nascidos prematuros. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia da cultura de *swabs* combinados para detecção da colonização materna por *S. agalactiae*

TIPO DE ESTUDO E LOCAL: Estudo prospectivo de acurácia diagnóstica realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

MÉTODOS: Foram obtidas amostras de 405 pacientes com idade gestacional entre 35 e 37 semanas. *Swabs* da região perianal (PA), intróito vaginal (IV) e terço distal da parede vaginal (PV) foram cultivados em caldo seletivo de Todd Hewitt e as colônias sugestivas de *S. agalactiae* foram submetidas aos testes de catalase e CAMP. Para avaliação da positividade de cultura de *swabs* combinados foi empregado o teste de Tukey para comparação de proporções.

RESULTADOS: A incidência de colonização por *S. agalactiae* foi de 25.4%. Dentre as pacientes colonizadas, 28.1% tiveram cultura positiva em apenas um local de coleta, 24.2% apresentaram positividade em dois locais simultaneamente e 47.5% nos três locais avaliados. A associação de *swabs* de dois locais de coleta aumentou significativamente o isolamento de *S. agalactiae* ($p<0.05$) quando comparado a único *swab*, exceto para coleta em PA. A utilização de *swabs* combinados de três locais de coleta mostrou taxas de isolamento estatisticamente superiores. CONCLUSÃO: Cultura de *swabs* combinados de três locais de coleta é mais eficiente para detecção de colonização materna por *S. agalactiae*.

PALAVRAS-CHAVE: *Streptococcus agalactiae*, gestação, swabs combinados, cultura, colonização materna.

Abstract

CONTEXT AND OBJECTIVE: Maternal *Streptococcus agalactiae* colonization and early-onset neonatal sepsis have undergone intense worldwide study. Streptococcal neonatal disease is associated with significant morbidity and mortality in the perinatal period, mainly in premature neonates. The aim of this study was evaluate combined swab culture efficacy in detecting maternal *S. agalactiae* colonization.

DESIGN AND SETTING: This was a prospective and accuracy study carried out at Botucatu Medical School.

METHODS: Samples were obtained from 405 patients at between 35 and 37 weeks gestation. Swabbing from perianal region (PR), vaginal introitus (VI) and upper lateral vaginal vault (LV) were cultured in Todd Hewitt selective broth and suggestive colonies of *S. agalactiae* were submitted to catalase and CAMP test. To evaluate the combined swabs positivity Tukey test was used for proportion comparison.

RESULTS: Streptococcal colonization incidence was 25.4%. From these, 28.1% had positive culture in one site only, 24.2% simultaneously in two sites, and 47.5% in all three sites. Associating two swabs increased ($p<0.05$) *S. agalactiae* isolation compared to isolated swab, except from the anal region. Associating swabs from three collection sites gave statistically higher detection rates.

CONCLUSION: Combined swab culturing from three collection sites is more efficient for detecting *S. agalactiae* colonization.

KEY WORDS: *Streptococcus agalactiae*, pregnancy, combined swabs, culture, maternal colonization.

Introduction

During the last few decades, maternal *Streptococcus agalactiae* colonization and early-onset neonatal sepsis have undergone intense worldwide study. Streptococcal neonatal disease is associated with significant morbidity and mortality in the perinatal period¹, mainly in premature neonates².

Gram-positive *S. agalactiae* can colonize the genitourinary and lower gastrointestinal tract of asymptomatic women. Colonization by this organism is associated with an increased risk of urinary tract infection³ and pregnancy complications such as endometritis³ and chorioamnionitis^{3,4}. Also neonates exposed to *S. agalactiae* can suffer severe consequences like pneumonia, sepsis, and meningitis⁵.

Vertical transmission of *S. agalactiae* occurs upon membrane rupture and by the neonate coming into contact with a colonized maternal birth canal during labor and delivery⁶. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) currently recommends screening all pregnant women for *S. agalactiae* between 35 and 37 weeks gestation⁷. For patients with vaginal or rectal positive cultures, intravenous penicillin prophylaxis is recommended during labor; since implementation this strategy has reduced 70% of early-onset neonatal sepsis since⁸.

According to literature, between 6.5%⁹ and 43.6%¹⁰ of pregnant women are colonized with *S. agalactiae* in vagina or rectum. Maternal colonization rates may differ according to culture media and collection site¹¹. Some studies are consistent in showing that combined swabs from different collection sites give up to 30% better yield than isolated vaginal swabs¹².

The purpose of this study was to evaluate the efficacy of combined swab culture in detecting maternal *Streptococcus agalactiae* colonization, using vaginal and perianal samples.

Materials and Methods

This prospective study was conducted at Botucatu Medical School, a public institution. Samples were obtained from 405 women with a gestational age between 35 and 37 weeks and singleton pregnancy.

Exclusion criteria were refusal to participate, symptoms of urinary infection or antibiotic use in the preceding 60 days, and sexual intercourse in the 72 hours preceding examination. After study approval by the ethics committee and written informed consent from all patients, vaginal and rectal samples were collected to assess the *S. agalactiae* status.

Samples were collected using distinct sterile swabs for vaginal introitus (VI), upper lateral vaginal vault (LV), and perianal region (PR). Samples were immediately inoculated into nonnutritive Amies transport medium for transportation to the Microbiology laboratory. Swabs were removed from the Amies medium and inoculated in Todd-Hewitt Broth supplemented with colistin (10µg/mL) and nalidixic acid (15µg/mL). Inoculated samples were incubated for 24 hours at 37°C. Broth was subcultured on 5% sheep blood Columbia agar base under the same conditions. Colonies suggestive of *S. agalactiae*, by presenting a narrow zone of beta-hemolytic, were submitted to catalase and CAMP test. Negative blood-agar plates were reincubated for an additional 18 to 24 hours and reexamined.

Statistical analyses were performed with SigmaStat software version 3.1. Comparisons were performed using the Tukey test with significance set at $p < 0.05$.

Results

During the study period, 567 patients with a gestational age of 35 to 37 weeks were seen at Botucatu Medical School Prenatal Service. A total of 162 patients were excluded, 106 due to receiving antibiotics; the other 56 refused to participate in the study. Considering all 405 women included in the study, maternal colonization rate for *S. agalactiae* was 25.4%.

As for collection site, *S. agalactiae* detection efficacy was evaluated by isolated and combined swabs from VI, LV and PR. A total of 103 culture-positive samples were included in this analysis. From all the women with *S. agalactiae* colonization, 14.5% had positive cultures in both VI and LV; 5.8 % in VI and PR, and 3.9% in LV and PR. Positive culture in all three collection sites was found in 47.5%, and in only one site in 28.1% (9.7% in VI; 3.9% in LV, and 14.5% in PR).

Statistical analysis of the efficiency of associating swabs from different sites revealed that using a combination of two swabs increased the yield of *S. agalactiae* over using an isolated swab, except when the swab was from the perianal region. Associating swabs from the three collection sites significantly increased detection of maternal *S. agalactiae* colonization (Table 1).

Discussion

The incidence of maternal colonization with *Streptococcus agalactiae* in the 405 women included in this study was similar to literature¹³⁻¹⁵. Culture accuracy may increase according to anatomic collection site and microbiological method. The procedures used to detect *S. agalactiae* were according to CDC recommendations¹².

In regard to evaluating combined swabs from vaginal sites, vaginal samples (introitus and lateral vault) were able to isolate more *S. agalactiae* than rectal samples (perianal region). These results are in agreement with others studies which also found higher detection rates in vaginal than rectal swabs^{16,17}.

Considering the effect of each anatomical site for *S. agalactiae* detection, the perianal region showed higher isolation frequency. According to Platt¹⁸, there is a significant increase in streptococcal isolation rate when the rectal region is also accessed than when using just vaginal culture. Because the gastrointestinal tract is natural reservoir for *S. agalactiae* and it is the likely source of vaginal colonization, the culture of rectal swabs has great importance in accessing the streptococcal status.

Our findings agree with literature¹⁹, that swabbing two and three anatomic sites both significantly increase the yield over one site. Also, the use of three collection sites, vaginal introitus, lateral vaginal vault, and perianal region, gave statistically superior *S. agalactiae* detection rates.

Conclusion

In conclusion, this data shows the high incidence of maternal *S. agalactiae* colonization in pregnant Brazilian women, and using combined culture from the perianal region, vaginal introitus, and vaginal lateral vault significantly increases *S. agalactiae* detection.

Acknowledgments

The authors wish to thank FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) for their financial support, grants 06/55307-0 and 07/51704-7.

References

1. Perinatal group B streptococcal disease after universal screening recommendations-United States, 2003-2005. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2007;56 (28): 701-5.
2. Schrag SJ, Zywicki S, Farley MM et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. N Engl Med. 2000;342 (1): 15-20.
3. Winn HN. Group B Streptococcus Infection in Pregnancy. Clin Perinatol. 2007; 34 (3): 387-92.
4. Yancey MK, Duff P, Clark P, Kurtzer T, Frentzen BH, Kubilis P. Peripartum infection associated with vaginal group B streptococcal colonization. Obstet Gynecol. 1994;84(5): 816-9.
5. Heath PT, Balfour G, Weisner AM et al. Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days. Lancet. 2004;363 (9405): 292-4.
6. Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in newborns: a global perspective on prevention. Biomed Pharmacother. 1995;49 (1): 19-25.

7. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep. 1996;45 (RR-7): 1-24.
8. Baltimore RS. Consequences of prophylaxis for group B streptococcal infections of the neonate. Semin Perinatol. 2007;31 (1): 33-8.
9. Yücesoy G, Caliskan E, Karadenizli A et al. Maternal colonisation with group B streptococcus and effectiveness of a culture-based protocol to prevent early-onset neonatal sepsis. Int J Clin Pract. 2004;58 (8): 735-9.
10. Gavino M, Wang E. A comparison of a new rapid real-time polymerase chain reaction system to traditional culture in determining group B streptococcus colonization. Am J Obstet Gynecol. 2007;197 (4): 388.e1-4.
11. Davies HD, Adair CE, Partlow ES, Sauve R, Low DE, McGeer A. Two-year survey of Alberta laboratories processing of antenatal group B streptococcal (GBS) screening specimens: implications for GBS screening programs. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999;35 (3): 169-76.
12. Schrag S, GorwitzPR, Fultz-Butts K, Schuchat A. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. MMWR Recomm Rep. 2002;16 (RR-11): 1-22.
13. Heelan JS, Struminsky J, Lauro P, Sung CJ. Evaluation of a new selective enrichment broth for detection of group B streptococci in pregnant women. J Clin Microbiol. 2005;43 (2): 896-7.
14. Bland ML, Vermillion ST, Soper DE, Austin M. Antibiotic resistance patterns of group B Streptococci in late-trimester rectovaginal cultures. Am J Obstet Gynecol. 2001;184 (6): 1125-6.

15. Kubota T. Relationship between maternal group B streptococcal colonization and pregnancy outcome. *Obstet Gynecol.* 1998;92 (6): 926-30.
16. El-Kersh TA, Al-Nuaim LA, Kharfy TA, Al-Shammary FJ, Al-Saleh SS, Al-Zamel FA. Detection of genital colonization of group B streptococci during late pregnancy. *Saudi Med J.* 2002;23 (1): 56-61.
17. 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 Af J Med.* 2000;46 (5): 115-20.
18. Platt MW, McLaughlin JC, Gilson GJ, Wellhoner MF, Nims LJ. Increased recovery of group B *Streptococcus* by the inclusion of retal culturing and enrichment. *Diagn Infect Dis.* 1995;21 (2): 65-8.
19. ACOG Committee opinion: number 279, December 2002. Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns. *Obstet Gynecol.* 2002;100 (6): 1405-12.

Table 1. Number of *S. agalactiae* isolates according to collection site.

	<i>S. agalactiae</i> isolates	
	N (%)	Combined swabs N (%)
VI	10 (9.7) ^c	-
LV	4 (3.9) ^c	-
PR	15 (14.5) ^{bc}	-
VI+LV	15 (14.5) ^b	29 (28.1) ^b
VI+PR	6 (5.8) ^b	31 (30.1) ^b
LV+PR	4 (3.9) ^b	23 (22.3) ^b
VI+LV+PR	49 (47.5) ^a	103 (100.0) ^a

Tukey test. Small letters used for group comparisons; values followed by same letter do not differ. VI= vaginal introitus; LV=upper lateral vaginal vault; PR=perianal region; VI+LV=combined vaginal introitus and upper lateral vaginal vault; VI+PR=combined vaginal introitus and perianal region; LV+PR= combined upper lateral vaginal vault and perianal region; VI+LV+PR=combined vaginal introitus, upper lateral vaginal vault, and perianal region.