

# GARDNERELLA VAGINALIS: RUOLO DI UN MICROORGANISMO EMERGENTE QUALE AGENTE VAGINOPATICO E SUO INQUADRAMENTO NELL'ECOSISTEMA MICROBICO VAGINALE

T. CEDDIA (a), M. BRANCA (b) e A. CASSONE (c)

(a) Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi, L'Aquila

(b) Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica; (c) Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

**Riassunto.** - In questa rassegna viene sistematicamente delineato il ruolo di un patogeno emergente, *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*), quale agente eziologico della cosiddetta "vaginite non-specifica". Il microorganismo viene inquadrato per le sue proprietà morfologiche, biochimiche e di virulenza nel vasto ecosistema microbico vaginale. Vengono anche discussi i principi diagnostici della malattia da esso provocata, nonché la possibile associazione di *G. vaginalis* ad altri batteri vaginali, in specie alcuni anaerobi, nel determinismo della malattia. I dati di letteratura internazionale sulla presenza di *G. vaginalis* in rari gruppi di popolazioni sono integrati da recenti ricerche degli Autori su prevalenza e carriage del microorganismo in un gruppo di donne ambulatoriali in Italia.

**Summary** (*Gardnerella vaginalis* and its role as vaginopathic agent and member of human vaginal flora). - In this review the role of an emergent pathogen, *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*), as aetiologic agent of the so called "non specific vaginitis" is systematically evaluated. The microorganism is described in its morphological, biochemical and virulence aspects in the framework of the complex vaginal ecosystem. The diagnostic criteria of the disease as well as a possible association of *G. vaginalis* with other vaginal bacteria, especially anaerobes, in the aetiology of the disease, are discussed. Literature data on prevalence and incidence of *G. vaginalis* in different population groups are integrated by more recent investigations of the Authors on prevalence and carriage of microorganism in a group of outpatients in Italy.

## Introduzione

Scopo di questa rassegna è tratteggiare criticamente il ruolo e l'importanza di un batterio, la *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*), quale agente di vaginite non specifica, un'entità clinica riconosciuta da molti anni ed attribuita a diverse forme batteriche, la cui diagnostica dif-

ferenziale con altre forme di vaginite ancora oggi è oggetto di intenso dibattito e varie interpretazioni. In generale, la rilevanza microbiologica e clinica di questa affezione è assai trascurata, specie nel nostro Paese, come documentato dalla completa assenza di ricerche eseguite in Italia i cui risultati siano stati riportati su qualificate riviste internazionali.

Quasi per niente conosciuto è, altresì, il batterio che provoca questa malattia, sul quale c'è ancora oggi confusione di nomi e di posizione tassonomica, senza contare che nulla si conosce di preciso circa i meccanismi patogenetici e l'immunità relativa a questa condizione patologica; e comunque scarse sono finora le acquisizioni circa la trasmissione dell'agente patogeno ed il suo controllo.

La rassegna non vuole essere una dettagliata analisi della letteratura al riguardo, ma un esame critico di quel poco che è già conosciuto sull'agente infettante e sulla malattia, con il proposito che il molto che invece non è conosciuto induca i ricercatori interessati al problema verso le necessarie, ulteriori ricerche sperimentali e cliniche. Recentemente l'argomento è stato trattato in varie rassegne in lingua inglese [1-4].

## Ecosistema vaginale

La conoscenza della fisiologia e della ecologia microbica della vagina è base indispensabile per un'accurata interpretazione e quindi per il trattamento più efficace delle varie patologie vaginali.

La flora vaginale è un "ecosistema" dinamico ed intercorrelato comprendente numerosi microorganismi, che subisce frequenti e notevoli mutamenti in rapporto soprattutto all'età ed al ciclo mestruale. Il significato della microflora normale nel suo interferire con la patogenesi di vari stati morbosi, che coinvolgono superfici mucose, è diventato sempre più importante, come è stato dimostrato da numerosi studi sperimentali [5-10].

Si è infatti visto quanto sia rilevante lo studio della microflora cervico-vaginale normale e patologica in rapporto a tutta una serie di patologie, quali vaginite di

difficile interpretazione, displasia cervicale, infezioni del tratto genitale superiore, corioamnionite, prematura rottura delle membrane, infezioni perinatali e sindrome da shock tossico [11]. La flora vaginale è un sistema influenzato da numerosi fattori fisiologici e secondari, quali il contenuto di glicogeno delle cellule epiteliali, glucosio, pH, assetto ormonale, gravidanze, parti, traumi, rapporti sessuali, trattamenti farmacologici ed altro, come riportato in Tab. 1.

Storicamente i primi studi sulla microflora cervico-vaginale sono stati di tipo descrittivo e riportavano principalmente la prevalenza di taluni microorganismi; è stato solamente a partire dagli anni '60, dopo l'introduzione di adeguate tecniche di coltura, che le indagini in questo campo si sono dimostrate più accurate e più significative, consentendo una migliore definizione della flora microbica cervico-vaginale.

#### *Le caratteristiche del secreto vaginale normale*

La vagina umana è tappezzata da epitelio pavimentoso stratificato identico a quello che copre l'esocervice. Non vi sono ghiandole nella mucosa vaginale ad eccezione delle ghiandole di Bartolini e di Skene, localizzate rispettivamente nell'ostio e vicino all'orifizio uretrale.

Il secreto vaginale, cioè la "perdita" vaginale normalmente presente, è di colore bianco, mucoide "a fiocchi", di consistenza molto vischiosa ed è costituito da vari componenti (Tab. 2), diversi nelle regioni dell'ostio vaginale, della vagina e della endocervice. Esistono in condizioni del tutto fisiologiche ampie variazioni della composizione quali-quantitativa del secreto vaginale soprattutto in rapporto all'età, alle diverse fasi del ciclo mestruale, alla costituzione endocrina del soggetto ed alla sua attività sessuale.

Il trasudato dalle pareti vaginali ed il muco cervicale sono i due maggiori costituenti del secreto vaginale; il terzo elemento di rilievo è rappresentato dalle cellule epiteliali esfoliate dalla mucosa cervicale, che sono di 3 tipi: superficiali, intermedie e parabasali. Le proporzioni di questi elementi dipendono dal tasso degli ormoni ovarici e dalla fase di stimolazione dei medesimi.

La quantità media di secreto vaginale nelle 24 ore, determinata con la tecnica dei tamponi o dei lavaggi intravaginali, è di 1-3 g [12] (Tab. 3). Se in queste determinazioni viene escluso il muco cervicale tramite diaframma, la quantità di secreto vaginale vero e proprio è minore nella fase ovulatoria rispetto a quella rilevabile nelle altre fasi del ciclo.

La quantità di secreto vaginale è significativamente più bassa nelle donne ovariectomizzate, mentre la somministrazione di ormoni estrogeni è in grado di far aumentare significativamente il secreto [13]. E' noto inoltre come la stimolazione sessuale sia in grado di far aumentare in 10-30 secondi la produzione di liquido vaginale quale risultato di un aumento del flusso ematico nell'area vaginale con conseguente maggiore trasudazione di liquido dalla parete della vagina [14]. La produzione giornaliera di muco cervicale, che varia da 200 a

Tabella 1. - *Fattori che influenzano la flora microbica vaginale*

Origine	Tipo
Anatomici	fistole, prolasso vaginale
Ormoni	età, ciclo mestruale, gravidanza, terapie ormonali
Contraccettivi e corpi estranei	IUD, diaframma, tamponi
Rapporti sessuali	liquido seminale, creme locali spermicide
Traumi	parto, interventi chirurgici
Misure igieniche	docce vaginali
Secrezione delle vie genitali superiori	mestruazioni, lochi
Malattie metaboliche	diabete mellito, uremia
Terapie	antibiotici, terapie immunosoppressive, terapia radiante

Tabella 2. - *Componenti del secreto vaginale normale*

1. Secrezioni delle ghiandole di Bartolini e di Skene
2. Trasudato dalla parete vaginale
3. Cellule epiteliali vaginali esfoliate
4. Muco cervicale
5. Fluido endometriale e tubarico
6. Leucociti

Tabella 3. - *Caratteristiche del normale secreto vaginale*

Quantità	1-3 g/24 ore
Colore	biancastro-mucoide
Consistenza	viscosa, flocculare
pH	< 4,5
Citologia	rari leucociti, numero variabile di cellule mononucleate, batteri bastoncellari (lattobacilli), cellule vaginali epiteliali con bordi distinti
Contenuto in acidi organici	predominante acido lattico
Di-amine (putrescina e cadaverina)	assenti

600 mg [15], e le sue caratteristiche biochimiche sono ormono-dipendenti, mutando a seconda della fase del ciclo mestruale e dell'età [16-19]. Il muco cervicale è costituito per il 92-98% da acqua e per il resto da componenti a basso peso molecolare quali sali inorganici ed organici, e ad alto peso molecolare quali macromolecole, proteine e glicoproteine; queste ultime, dette anche mucine, ne rappresentano la componente più specifica. Alcune macromolecole di natura enzimatica sono in grado di selezionare alcune specie microbiche [20, 21]. Il muco cervicale inoltre è dotato di proprietà chimico-fisiche peculiari, controllate dagli ormoni ovarici, in grado di ostacolare o favorire la migrazione degli spermatozoi [15].

Dal punto di vista biochimico, i costituenti organici maggiori della secrezione vaginale normale sono le proteine, i carboidrati, l'urea e gli acidi grassi. Le proteine del liquido vaginale originano in parte per trasudazione delle proteine del siero ed in parte vengono prodotte dalle strutture ghiandolari della cervice e nel tratto genitale superiore. I maggiori componenti proteici sono le albumine e le immunoglobuline; sono anche presenti singoli aminoacidi [19]. Le immunoglobuline provengono probabilmente proprio dal muco cervicale, anche se non è escluso che la vagina stessa possa avere una funzione immunitaria secernente, in particolare di IgA. E' stato infatti da alcuni Autori segnalato come il tessuto vaginale della coniglia sia in grado di sintetizzare IgA ed IgG [22] ed inoltre è stata dimostrata la presenza di plasmacellule nella mucosa vaginale [12]. Nella vagina di tutte le donne vi è produzione di acidi organici in alcuni casi particolarmente elevata, soprattutto acido lattico ed acido acetico, che aumentano tipicamente a metà del ciclo diminuendo in fase luteinica.

Alcuni Autori [23] hanno studiato la quantità di acidi grassi organici volatili (acetico, propanoico, metilpropanoico, butanoico, metilbutanoico, metilpentanoico) che sono presenti nelle secrezioni vaginali delle donne oltre che nelle femmine di primati [24, 25]. Le mescolanze di acidi grassi organici a basso peso molecolare determinano l'odore vaginale in rapporto alla loro vaporizzazione alla normale temperatura corporea, al loro grado di dissociazione ed al pH vaginale. La maggiore produzione di acidi organici deriva probabilmente da bioprodotti metabolici della flora batterica, per cui la loro presenza è un indice della flora microbica prevalente. Come è stato dimostrato da Michael e Keverne, gli acidi organici posseggono proprietà di attrazione sessuale nella scimmia stimolando l'attività sessuale dei maschi per via olfattiva (copuline) [26]. E' stata anche dimostrata con tecniche gascromatografiche la presenza di tali acidi volatili in 682 campioni vaginali umani [27]. Si è osservato che le donne che assumono contraccettivi orali hanno una più bassa quantità di acidi volatili e non presentano le tipiche alterazioni ritmiche del contenuto di tali acidi durante il ciclo mestruale [27]. La Tab. 3 riassume le caratteristiche del secreto vaginale normale.

### *La flora microbica vaginale normale*

La vagina della neonata è inizialmente colonizzata da batteri acquisiti durante il passaggio nel canale del parto. L'abbondanza in glicogeno delle cellule epiteliali vaginali, dovuta agli estrogeni trasmessi dalla madre, favorisce la crescita, per un periodo di circa 2-3 settimane in un ambiente acido, di una flora microbica omogenea di bastoncini Gram-positivi, collettivamente conosciuti come bacilli di Döderlein (*Lactobacillus* spp.) [28, 29]. Döderlein infatti fu il primo nel 1892 [28] ad investigare con completezza la flora microbica vaginale mettendo già allora in rilievo l'importanza dei lattobacilli. Dopo questo periodo nella neonata l'epitelio vaginale diventa sottile e atrofico con basso contenuto di glicogeno, il pH si innalza a valori di neutralità, la flora vaginale cambia e fino alla pubertà comprende di norma micrococchi, streptococchi, difteroidi, ma raramente lattobacilli [28]. Alla pubertà, con l'inizio del menarca e con l'aumentata secrezione di estrogeni, l'epitelio vaginale prolifera e si ispessisce con deposizione di glicogeno nel citoplasma cellulare.

Il glicogeno è metabolizzato ad acido lattico, il quale a sua volta abbassa il pH vaginale, nell'intervallo 4-5, e l'ambiente acido favorisce la crescita di lattobacilli e di altri microorganismi acidofili. E' anche probabile che il basso pH limiti o regoli la crescita di altri batteri. Numerosi meccanismi sono probabilmente responsabili di questo processo [30]: a) altri batteri oltre ai lattobacilli sono in grado di elaborare enzimi che metabolizzano il glicogeno ad acido lattico; b) il glicogeno può essere degradato da enzimi presenti nelle cellule epiteliali vaginali a monosaccaridi che a loro volta vengono metabolizzati ad acido lattico dai lattobacilli e c) alcuni enzimi dell'epitelio vaginale sono in grado di metabolizzare direttamente il glicogeno ad acido lattico.

Un ambiente vaginale acido e una flora microbica costituita prevalentemente da lattobacilli sono presenti nelle donne adulte e sane per tutto il periodo fertile. Alla menopausa vi è poi un ulteriore e definitivo cambiamento: l'epitelio vaginale va incontro gradualmente ad atrofia perdendo il suo contenuto di glicogeno; la flora vaginale ritorna ad essere una flora mista, simile a quella presente prima della pubertà [29, 31, 32].

Durante la gravidanza, conseguentemente all'aumentata secrezione di ormoni estrogeni e alla deposizione di glicogeno, aumenta la colonizzazione da parte dei lattobacilli, mentre diminuiscono gli altri microorganismi (specie gli anaerobi) [33]: è questa una delle reazioni fisiologiche della gravidanza normale finalizzata alla protezione del feto sia quando esso è all'interno dell'utero, sia quando alla nascita attraversa un canale riccamente colonizzato da lattobacilli [32].

*La flora aerobica.* - Rogosa e Sharpe [34] in un classico studio del 1960 rilevarono come nella flora microbica vaginale siano presenti varie specie di lattobacilli, alcuni dei quali non scindono il glicogeno. Questi Autori isolarono 35 ceppi di lattobacilli da 21 donne

sane, non gravide, di età tra i 21 ed i 40 anni. E' quindi più corretto parlare di microorganismi Gram-positivi aerobi, acidogeni, costituiti per il 70% da lattobacilli acidofili e per il rimanente da altri Gram-positivi.

I lattobacilli hanno la caratteristica metabolica di degradare in anaerobiosi il glicogeno ed altri carboidrati ad acido lattico e ad acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [35], composti dotati entrambi di attività antibatterica. Inoltre i lattobacilli producono le "lattocidine" [36], composti biologici dotati pure essi di antagonismo microbico.

I lattobacilli, pertanto, trovano un substrato metabolico ideale nel glicogeno delle cellule epiteliali di rivestimento della vagina, le quali, sotto l'influsso degli ormoni ovarici, desquamano continuamente nel lume vaginale. In tal modo i lattobacilli sono responsabili, come già detto, del pH fortemente acido dell'ambiente vaginale. Ne deriva che strisci vaginali ricchi di lattobacilli sono in genere considerati espressione di una vagina sana mentre strisci con scarsi lattobacilli vengono interpretati come indice di una maggiore suscettibilità alle infezioni. Come sarà menzionato nel proseguo di questa rassegna, è da notare però che i lattobacilli sono solo una componente della normale flora microbica vaginale e che la normalità dell'ambiente vaginale è assicurata da varie e complesse interrelazioni fra le varie classi di microorganismi presenti in vagina.

Già Weinstein e Wickerham nel 1938 [37] avevano riscontrato come dopo il trattamento con estrogeni si aveva una diminuzione del pH vaginale senza un aumento della colonizzazione da parte dei lattobacilli. La predominanza dei lattobacilli risultava secondo questi Autori dalla selezione di lattobacilli acido-tolleranti in grado cioè di resistere in un ambiente fortemente acido reso tale da altri batteri. Non è dimostrato sufficientemente che l'acidità del pH sia discriminante per la crescita dei lattobacilli, in quanto l'endocervice, che ha un pH vicino alla neutralità, ha una flora in genere simile se non identica a quella presente in vagina. Molti lattobacilli, come già dimostrato da Rogosa e Sharpe [34], non scindono affatto il glicogeno. Infine la deficienza di glicogeno nell'epitelio cervico-vaginale in postmenopausa non è sempre presente [38]. Uno studio comparativo della microflora delle vie genitali in donne in premenopausa e menopausa non ha dimostrato alcuna differenza statisticamente significativa nel numero o nel tipo delle specie microbiche isolate dalla cervice o dalla vagina. Inoltre donne in postmenopausa in terapia con estrogeni o senza presentavano una microflora genitale simile [39].

I difteroidi comprendono la maggior parte dei rimanenti batteri aerobi facoltativi Gram-positivi. Fin dai primi studi di Döderlein, essi sono stati considerati in grado di svolgere un ruolo di protezione con l'ostacolare la colonizzazione da parte di specie batteriche virulente. I cocchi Gram-positivi aerobi facoltativi sono rappresentati dagli stafilococchi e dagli streptococchi. In un numero abbastanza significativo di donne è presente lo *Staphylococcus epidermidis*. Invece alcuni dei batteri più frequentemente isolati da infezioni delle vie genitali

quali lo Stafilococco aureo, lo Streptococco β-emolitico di gruppo B, l'*Escherichia coli*, il *Clostridium perfringens*, gli Streptococchi anaerobi, il *Bacteroides fragilis*, non sono abitualmente isolati dalla normale flora vaginale della donna adulta sana.

La Tab. 4 offre un quadro generale dei batteri nella flora vaginale normale.

*La flora anaerobica.* - Diversi gruppi di microorganismi anaerobi sono stati isolati nel secreto cervico-vaginale di donne adulte e sane: il loro tasso di isolamento varia a seconda degli Autori dal 4% [40, 41] al 65% [42, 43], fino al 70-80% [44] e queste differenze, oltre a rappresentare probabilmente intrinseche differenze nelle popolazioni studiate dai vari Autori, riflettono altresì diversi metodi di coltura più o meno idonei. Studi quantitativi hanno dimostrato che il numero degli anaerobi è spesso di un ordine di grandezza superiore a quello degli aerobi [45]. Nella vagina della maggior parte di donne adulte sane gli anaerobi più comuni sono i peptococchi ed i peptostreptococchi. Per quanto riguarda le specie del genere *Bacteroides*, ne sono presenti varie: il *B. bivius* è spesso isolato, a differenza del *B. fragilis* che sembra meno frequente, come pure le specie di Fusobatteri.

La flora anaerobica è particolarmente interessante anche perché è frequentemente coinvolta nelle infezioni cervico-vaginali, specie dopo interventi chirurgici; d'altro canto, in condizioni normali, si oppone efficacemente alla colonizzazione vaginale da parte di altri

Tabella 4. - *Principali batteri presenti nella vagina normale di donne sane*

	Aerobi	Anaerobi
Cocchi Gram-positivi	<i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	<i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i>
Batteri Gram-positivi	<i>Lactobacillus</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Listeria</i> <i>Mycobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Clostridium</i>
Cocchi Gram-negativi	<i>Neisseria</i>	<i>Veillonella</i>
Batteri Gram-negativi	<i>Escherichia</i> <i>Proteus</i> <i>Klebsiella</i> <i>Serratia</i> <i>Citrobacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Actinobacter</i> <i>Mycoplasma</i> <i>Ureaplasma</i> <i>Alcaligenes</i>	<i>Bacteroides</i> <i>Fusobacterium</i>

Modificata da Huggins e Preti [19].

batteri virulenti, in particolare gli enterobatteri [5-9]. La flora anaerobica cambia in funzione dell'influenza ormonale ovarica ed inoltre può giocare un ruolo nella crescita di *Candida albicans*. La flora anaerobica è infatti molto più abbondante prima del menarca e dopo la menopausa che non durante il periodo fertile [39, 46].

Interessanti, anche se non univoci, sono i risultati della colonizzazione da parte di batteri aerobi (o facoltativi) e anaerobi, e dei loro vicendevoli rapporti quantitativi a seconda della fase del ciclo mestruale. Secondo Brown [47], le più elevate conte batteriche nella microflora vaginale si ottengono nella fase premenstruale ~ 10<sup>9</sup> batteri/ml, mentre la colonizzazione è definitivamente inferiore nella fase mestruale (~ 4,0 x 10<sup>7</sup>/ml). Bartlett *et al.* [45] riportano valori assoluti non sostanzialmente diversi, considerate tutte le variabili in gioco (tecniche di campionamento, popolazioni diverse, ecc.), ma non notano differenze sostanziali nel numero degli anaerobi a seconda della settimana del ciclo. Notano, tuttavia, una significativa diminuzione della concentrazione degli aerobi/facoltativi nella fase premenstruale.

Questi studi hanno dimostrato notevoli variazioni nel numero di ogni batterio quando campioni multipli sono ottenuti dalla stessa persona. Nelle donne con normale secrezione vaginale non vi sono differenze nella prevalenza generale di batteri (anaerobi, coliformi, Streptococchi β-emolitici) isolati dalla escorcice e dai fornici vaginali [48]. L'orifizio uterino esterno e la porzione inferiore del canale cervicale contengono una flora batterica simile a quella della parte più alta della vagina, mentre la porzione superiore del canale cervicale è sterile o contiene talora uno scarsissimo numero di microrganismi [49].

I meccanismi che promuovono queste alterazioni nei rapporti tra gruppi di batteri sono sconosciuti ma possono includere mutamenti del pH vaginale, del contenuto di glicogeno e della vascolarizzazione. L'aumento fisiologico dei lattobacilli dall'inizio della gravidanza fino al parto può servire a proteggere il feto da microrganismi più virulenti al momento della nascita. Dopo il parto, un aumento nella prevalenza di anaerobi virulenti, quali il *B. fragilis* e di altri microrganismi, quali l'*E. coli*, possono promuovere infezioni puerperali [33]. Neanche i meccanismi che portano a queste profonde alterazioni nella flora vaginale, immediatamente dopo il parto, sono precisamente conosciuti ma probabilmente sono dovuti a traumi, alla presenza di lochi, a contaminazione vaginale da flora enterica oppure a squilibri ormonali. In effetti i livelli di estrogeni nel *post-partum*, particolarmente nelle donne che allattano, sono molto bassi. Vi è inoltre un aumento nella prevalenza di microrganismi anaerobi nelle donne in postmenopausa che non assumono estrogeni; una situazione analoga alla flora batterica osservata nelle bambine nel periodo precedente il menarca.

Interventi chirurgici quali, ad esempio, l'isterectomia, possono causare maggiori alterazioni nella flora, come proliferazione di anaerobi e di enterobatteri [50, 51].

Il ruolo dei contraccettivi intrauterini (IUD) è di particolare interesse. Lo IUD determina localmente irritazione meccanica, aumenta il numero dei leucociti ed aumenta l'entità della secrezione mucosa, in tal modo abbassando il pH vaginale. Alcuni Autori [48] hanno studiato un ampio numero di donne di un centro per la pianificazione familiare: una più alta prevalenza di anaerobi era presente nel secreto vaginale di donne portatrici di IUD che non in quelle non portatrici.

Il coito può anche avere un effetto importante sulla flora vaginale. Strisci vaginali senza spermatozoi spesso contengono batteri di Döderlein, mentre strisci con spermatozoi spesso contengono una prevalenza di coccoformi. Lo sperma ha un forte effetto alcalinizzante sul secreto acido vaginale con conseguente aumento del pH vaginale. Teoricamente, quindi, i rapporti sessuali non protetti possono alterare la flora vaginale normale. Tuttavia una relazione più precisa tra rapporti non protetti, grado di attività sessuale e alterazioni della flora batterica vaginale non è ancora conosciuta.

### Le vaginiti specifiche

Le vaginiti si definiscono come flogosi della parete vaginale e/o leucorrea e/o prurito.

La vaginite è la più comune delle malattie infettive dell'apparato genitale femminile: si calcola che ogni anno ne siano affette alcune decine di milioni di donne in tutto il mondo [52].

Tralasciando le cause non infettive, quali vaginite da corpi estranei, da prodotti chimici, la vaginite atrofica e la neuro-dermatite, le cause microbiche, cui abbiamo limitato il presente studio, possono essere notevolmente influenzate da alcune concause o fattori predisponenti di tipo locale o generale:

- locale: aumento della secrezione della cervice con conseguente innalzamento del pH vaginale, uso di tamponi endo-vaginali, contraccettivi locali, igiene insufficiente e/o malcondotta, indumenti non traspiranti;

- generale: diabete, deficit immunitari, squilibri endocrini, gravidanza, contraccettivi orali, terapie immunosoppressive, contaminazioni da focolai più o meno vicini (urinari e intestinali).

L'eziologia microbica delle vaginiti specifiche include: virus, batteri, funghi e protozoi. Fra i batteri distinguiamo classici Gram-positivi e Gram-negativi, i micoplasmia e le forme batteriche rudimentali quali la *Chlamydia*.

I batteri classici sono responsabili di circa il 30-40% dei casi di vaginite. I più frequenti sono Enterobatteri, Streptococchi, Stafilococchi, Gonococchi.

Micoplasmia: quali agenti di flogosi dei genitali esterni furono descritti da Dienes ed Edsall nel 1937 [53], che li isolarono dalle ghiandole del Bartolini. Tra

le varietà di micoplasmi, solo 2 sono frequenti nelle vie genitali: il *Mycoplasma hominis* e l'*Ureoplasma urealyticum* o *T-Mycoplasma*. Si pensa che una prima colonizzazione avvenga alla nascita per poi diminuire progressivamente fino alla pubertà, dopo di che si verifica una nuova contaminazione di tipo venereo [54]. In donne sessualmente attive i micoplasmi sono frequentemente presenti in qualità di saprofiti. La loro presenza è correlata con l'aumento dell'attività sessuale, la leucorrea e le vaginiti non specifiche. Sono associati a infezioni intramniotiche, rottura prematura delle membrane, infiammazione della placenta, febbre *post-partum*, aborto spontaneo. Il *Mycoplasma hominis* è responsabile di cervico-vaginiti; si è riscontrata la presenza di questo microorganismo con frequenza doppia nelle donne con vaginite o cervicite rispetto a pazienti sane [54, 55]. Il *Mycoplasma* è più frequente quando nell'ambiente vaginale vi è un pH elevato e molto spesso è associato ad altri microorganismi, quali *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans* ed *Haemophilus vaginalis* [55, 56].

*Chlamydia trachomatis*: è responsabile anche di molte uretriti, cerviciti e salpingiti e talora di sterilità. Fra le donne visitate in centri per malattie veneree si riscontra nel 18-31% dei casi. Nelle donne sane è presente in ragione del 2-7% allo stato saprofitario, essendo talora associata al gonococco [57].

Virus: tralasciando le frequenti lesioni da papilloma virus di tipo umano (HPV), il riscontro più abituale è la vulvo-vaginite da *Herpes simplex* di tipo 2, talora di tipo 1. E' malattia contagiosa a larga diffusibilità. Lesioni simili per aspetto, sia macroscopiche che microscopiche sono provocate anche da *Citomegalovirus* e *Adenovirus*. L'*Herpes simplex* di tipo 2 può condurre all'aborto e a grave manifestazione erpetica del neonato. Le donne diventano portatrici sane e spesso trasmettono il contagio col rapporto sessuale [58].

Miceti: sono responsabili del 20-25% dei casi di vaginite. Sono più frequenti gli isolamenti in pazienti con deficit immunitari, in diabetiche, in gravide, nel corso di prolungata chemioterapia. Agente di gran lunga più frequente è la *Candida albicans*, che può provenire anche dall'intestino; ma altre specie, tipo *Candida glabrata*, possono avere un'alta prevalenza in specifiche situazioni [59].

Protozoi: sono causa del 20-25% dei casi di vaginite. Tranne rare eccezioni, dovute a *Giardia lamblia* e *Balanitidium coli*, l'agente più comune è il *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), che può colonizzare anche l'uretra maschile, le vescicole seminali e la prostata, talora senza alcun disturbo apprezzabile. E' stato riscontrato in vagina sin dal 1836 [60], successivamente nell'uretra maschile dal 1896 e proposto quale agente di vaginite nel 1916 [61]; è stato riscontrato nel 3-15% di donne asintomatiche e fino al 50% di donne sintomatiche con

evidenza clinica di malattie trasmesse per via sessuale [62]. L'infezione avviene quasi esclusivamente per contagio sessuale: nella donna essa è limitata alla vulva, alla vagina, alla cervice, all'uretra nel 45% dei casi; alle ghiandole parauretrali di Skene nel 40% dei casi ed alle ghiandole di Bartolini nel restante 15%. Negli USA è colpito il 10% o meno delle donne sane [62] e più del 30% di donne afferenti a centri per malattie sessualmente trasmesse [63]. Nei paesi tropicali il 15-40% di donne sane in età fertile sono portatrici di infezione da *T. vaginalis* e nel 37% dei casi contemporaneamente a infezione gonococcica e altri patogeni [63]. Talora è associato con *G. vaginalis* e con anaerobi, ma non con i miceti. La frequenza di trichomoniasi vaginale è maggiore nelle donne appartenenti a classi sociali ed economiche basse, con scarsa igiene sessuale e partners sessuali multipli.

### La vaginite cosiddetta non specifica

#### Cenni storici

Per molti anni prima del 1954 la letteratura internazionale riguardante le vaginiti si è occupata quasi esclusivamente di trichomoniasi e cosiddetta moniliasi (candidosi o candidiasi), oltre alle note flogosi da gonococco [64, 65].

Un altro tipo di vaginite, detta comunemente "non specifica", di origine batterica, non veniva considerata sufficientemente importante dai ricercatori, perché accompagnata in genere da un più modesto corteo sintomatologico. Il termine "vaginite non specifica" (VNS), fu attribuito per lungo tempo a infezioni clinicamente simili causate da più distinti batteri. Alcuni Autori hanno preferito chiamare tale sindrome "vuginosi batterica" [66] o "vuginosi anaerobica" [67], in quanto associata con anaerobi misti, poiché non sempre sono riscontrabili segni evidenti di flogosi vaginale, tali da poterla distinguere nettamente dalle uretriti non specifiche, e perché più che un'infezione trasmessa per via sessuale sarebbe una sequela batteriologica di un disordine fisiologico [67, 68].

Secondo Spiegel *et al.* [69], da una dettagliata analisi della flora microbica associata con la vaginite non specifica, risultava che vari batteri anaerobi Gram-negativi agivano sinergicamente nel determinare la malattia, ed essi erano pure responsabili di una parte dei sintomi.

Nel 1954 H.L. Gardner, ginecologo di Houston (con la collaborazione di Dukes), notò che la grande maggioranza delle vaginiti non specifiche costituivano una entità clinica ben definita [64]. Vi era in genere una leucorrea modesta, bianco-grigiastra ed omogenea, emanante un cattivo odore di pesce marcio; i sintomi irritativi e il prurito erano lievi o assenti; l'esame microscopico diretto del secreto vaginale mostrava abbondante flora batterica e scarsa presenza di leucociti; il pH del secreto era lievemente aumentato rispetto alla norma [64, 65].

## Eziopatogenesi

Gardner notò, mediante l'esame microscopico, che la flora batterica presente nel secreto vaginale di donne affette da VNS era uniforme e che nella grande maggioranza dei casi il batterio presente in abbondanza sembrava essere sempre lo stesso: un piccolo batterio pleiomorfo Gram-negativo. Tale costante ed univoco reperto contrastava con le molteplici specie batteriche che si sviluppavano in coltura. Gardner concluse che l'organismo, quasi sempre presente e dominante negli esami microscopici diretti, non era in grado di moltiplicarsi in coltura. Il batteriologo Dukes, collaboratore e coautore di Gardner, pensò quindi di seminare i secreti vaginali in diversi terreni, arricchiti diversamente ed incubati in diversi ambienti. Dukes poté così notare che piccole colonie trasparenti, visibili a luce riflessa, si sviluppavano più costantemente di altre, e che le colonie erano costituite da batteri simili a quelli che abbondavano negli esami microscopici diretti dei secreti vaginali delle donne con vaginite non specifica. Il reperto fu identico in tredici delle quattordici pazienti affette dalla stessa entità clinica. Gardner e Dukes pensarono di aver trovato finalmente l'agente specifico delle vaginiti cosiddette "non specifiche" e lo chiamarono *Haemophilus vaginalis*, in seguito classificato come *Gardnerella vaginalis* [65].

Ulteriori e più ampi studi degli stessi Autori e di Kaufman, confermarono la prima osservazione [70-73]. Altri Autori si sono occupati successivamente dell'argomento, e molti hanno contraddetto in tutto o in parte le tesi di Gardner e Dukes. Alcuni hanno sostenuto che quelle entità cliniche non sono vaginiti, ma variazioni della normale flora vaginale, da cui il nome di "vaginosi anaerobica" [67, 68] o "vaginosi batterica" [66]; altri hanno sostenuto che l'*H. vaginalis* (*G. vaginalis*) non è un germe patogeno, isolandosi abbondantemente in donne sane [74, 75]; altri ancora che il batterio è solo concausa delle vaginiti non specifiche insieme con gli anaerobi [76-78]. Le tesi suddette sono state confutate da Gardner e Dukes. La querelle più animata e attuale, dopo quella sviluppatasi negli anni passati e ormai placata intorno alla posizione tassonomica di questo batterio (da noi riportata in altro capitolo), si sviluppa circa il suo ruolo e quello degli anaerobi nella patogenesi della VNS. Che questa sia determinata da *H. vaginalis* è sostenuto da Brown, Kaufman e Gardner con le seguenti tesi [79]:

a) la classica malattia è indotta in donne adulte e sane dall'inoculo di colture pure di *G. vaginalis* in vagina, dopo incubazione di circa cinque giorni;

b) nessun altro microorganismo specifico è stato trovato consistentemente insieme a *G. vaginalis*;

c) accanto ad esso, sempre prevalente (per lo più 100:1), si trovano diverse specie microbiche in minor concentrazione;

d) le pazienti guariscono eliminando con antibiotici (per es. cefradina) *G. vaginalis*, mentre gli anaerobi, insensibili, permangono;

e) spesso si isola *G. vaginalis* ma non anaerobi;

f) *G. vaginalis* non può essere considerata saprofita soltanto perché isolata in donne sane portatrici, considerate prive di esperienze sessuali, per il solo fatto che esse lo sostengono in un questionario confidenziale;

g) dalla vagina di donne sane o malate viene isolata una pleora di batteri aerobi e anaerobi, sempre considerati indigeni e non patogeni;

h) anche in vaginiti che abbiano un conclamato agente etiologico, quale (*Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*) viene incoraggiata la moltiplicazione di numerosi anaerobi, che non per questo assumono un ruolo primario o rilevante nei riguardi dell'infezione;

i) non si conoscono singoli patogeni anaerobi capaci di causare tale vaginite;

l) quando alcune portatrici di *G. vaginalis* non mostrano segni di malattia, il numero di batteri in vagina è piccolo.

Nonostante queste precise osservazioni, la problematica della VNS è ancora aperta dal punto di vista eziologico: ulteriore discussione su questo punto sarà presentata in un successivo capitolo.

## Diagnosi clinica

Sono quattro i segni patognomici di vaginite cosiddetta non specifica.

1) Le caratteristiche "clue-cells", presenti quasi costantemente nell'esame microscopico diretto "a fresco" degli strisci vaginali: la superficie delle cellule epiteliali vaginali, e specialmente i loro margini, appaiono punteggiate di batteri, come recentemente rilevato anche da Giacomini *et al.* [80] attraverso l'esame citologico in preparati cervico-vaginali colorati col Papanicolaou. Va detto tuttavia che occasionalmente anche difteroidi e cocci possono dare questa immagine. Il campo microscopico appare povero di leucociti, mentre la flora batterica è abbondantemente e uniformemente rappresentata da piccoli bastoncelli Gram-negativi; talora sono presenti anche altri microorganismi, specialmente vibrio-like (*Mobiluncus*) e streptococchi Gram-positivi [81]; i lattobacilli sono scarsi o assenti. Secondo Giacomini *et al.* [80] l'aspetto diagnostico caratteristico non sta tanto nel riscontro delle "clue-cells" più tipico dell'esame a fresco, quanto nel rilievo nello striscio colorato col Papanicolaou della cosiddetta "sabbia batterica" che forma un film sul fondo e un vallo attorno a molte cellule epiteliali squamose. Inoltre l'effetto tossico delle poliamine produce intensa esfoliazione, pseudopicnosi e pseudoeosinofilia delle cellule vaginali. Un'immagine caratteristica delle "clue-cells" è riportata in Fig. 1.

2) Il pH vaginale è aumentato mediamente sino a 5-5,5. Ritorna alla norma dopo eradicazione della VNS.

3) Ulteriore importante carattere è la positività del test delle amine: l'aggiunta di poche gocce di KOH al 10% al secreto vaginale (in provetta o su vetrino) sviluppa odore di pesce marcio (classico Pheifer-test o whiff o amine-test degli Autori anglosassoni) [75].

4) Il secreto è di colorito bianco-grigiastro, omogeneo, viscoso, aderente alle pareti vaginali in un sottile film.

Le caratteristiche diagnostiche differenziali e la relativa sintomatologia della VNS rispetto ad altre principali vaginiti sono riportate nelle Tab. 5 e 6.

Per far diagnosi di VNS non tutti gli Autori sono in accordo circa la presenza dei segni suddetti; alcuni pretendono la presenza di almeno tre dei quattro segni, altri di due segni, altri di uno o più segni. Il disaccordo si fonda su due cause fondamentali: la soggettività del rilevamento di alcuni segni e la difficoltà che talora riscontra l'operatore nel rilevamento. Ciò può incidere notevolmente sulle conclusioni statistiche di numerosi Autori [82, 83].

Una particolare disamina merita l'origine dell'odore dei secreti vaginali, anche per la rilevanza nella eziologia della sindrome. L'esame cromatografico dei secreti vaginali di donne affette da VNS dimostra la presenza di amine (specialmente putrescina e cadaverina, che diventano volatili in presenza di KOH) e di acidi organici [68, 76, 82].

Spiegel *et al.* [77] hanno studiato mediante cromatografia gas-liquida, il secreto vaginale di donne normali e di donne affette da VNS ed hanno correlato i risultati con la ricerca di anaerobi eseguita con colture quantitative. Nei secreti normali predomina lattato in associazione con *Lactobacillus species* e *Streptococcus spp.* (lattato-produttori). Nelle VNS il lattato diminuisce, mentre aumentano succinato, acetato, butirrato (anche capace di generare cattivo odore [84]), e propionato; predomina la flora costituita da *G. vaginalis* (acetato-produttori) e *Peptococcus spp.* (butirrato e acetato-produttore); il *B. fragilis* è di rarissimo riscontro [45, 84, 85]. Dopo terapia con metronidazolo gli acidi organici a breve catena e la flora batterica tornano nella norma. Spiegel conclude che la causa di VNS sono gli anaerobi insieme con la *G. vaginalis*, e che un alto rapporto succinato/lattato nel fluido vaginale è un utile indicatore nella diagnosi di questa condizione [77].

Chen *et al.* [82] mediante cromatografia liquida, trovarono diamine (cadaverina e putrescina) nell'88% di 197

donne con VNS o vaginite da *T. vaginalis* mentre nel 90% di 323 donne senza VNS o vaginite da *T. vaginalis* la ricerca delle diamine era negativa; la loro presenza era inoltre correlata alla terapia con metronidazolo e alla risposta clinica. Chen attribuisce la VNS all'associazione anaerobi + *G. vaginalis*, pur se il meccanismo d'azione non gli risulta del tutto chiaro. In un altro studio [76] Chen ha esaminato le amine presenti nel fluido vaginale di donne con o senza VNS. Nelle pazienti furono trovate sette amine non presenti nei soggetti normali: metilamina, isobutilamina, putrescina, cadaverina, nistamina, tiramina, fenetilamina. Le più abbondanti e costanti erano putrescina e cadaverina.

Verosimilmente *G. vaginalis*, che genera aminoacidi e chetoacidi (specialmente acido piruvico), e gli anaerobi obbligati, che producono amine maleodoranti per decarbossilazione dagli aminoacidi corrispondenti, sono i responsabili associati delle VNS. A pH acido le amine si trovano sotto forma di sali e sono non-volatili; l'aumento di pH converte le amine nella forma libera, che, essendo volatile, genera il cattivo odore.

### Terapia

Trattamento d'elezione della vaginite non specifica è il metronidazolo per via orale alla dose di 500 mg due volte al giorno per 7 giorni [67, 75, 83] anche se è stato dimostrato che un'unica dose di 2 g può essere ugualmente attiva [86, 87]. Derivati quali il nimorazolo ed il tinidazolo sono ugualmente efficaci [88].

L'effetto terapeutico del metronidazolo è dovuto ad un'azione diretta sulla *G. vaginalis*, ma anche sugli anaerobi [75, 89, 90] ed è stato suggerito che l'attività anti-gardnerella del metronidazolo sia esplicata principalmente dal suo metabolita bioattivo idrossilato [91]. Con la terapia farmacologica, che può causare quale effetto collaterale nausea, va prescritta astinenza dall'alcool. L'efficacia della terapia con metronidazolo si aggira intorno al 70-90% dei casi. La guarigione avviene spesso in tempi molto brevi: in un solo giorno scompaiono perdite e cattivo odore; scompaiono all'esame "a fresco" le "clue-cells" e l'agente causale. Anche gli anae-

Tabella 5. - Caratteristiche diagnostiche differenziali del secreto vaginale nelle principali vaginiti

Caratteristiche	Normale	VNS	Candidosi	Tricomoniasi
Presente all'ostio vaginale	No	Si	Si	Si
Colore	Bianco	Grigiastro	Bianco	Verde-chiaro
Viscosità	Alta	Alta	Bassa	Bassa
Consistenza	Flocculare	Omogenea	A ricotta o a latte cagliato	Omogenea
pH	< 4,5	> 4,5	4-5	6-7

Tabella 6. - Sintomatologia nelle principali vaginiti

Sintomi	VNS	Candidosi	Tricomoniasi
Irritazione/Dolore vulvare	-	+	+
Eritema vulvare	-	+	+
Dispareunia	-	+	+
Prurito	-	+	+
Perdite vaginali	+	+	+
Odore sgradevole	+	-	+

robi ed il *Mobiluncus*, se presenti prima, scompaiono. Ricompaiono i lattobacilli ed il pH si ristabilisce intorno a 3,5 in due o tre giorni. In caso di fallimento della suddetta terapia possono essere usati per via generale, penicillina, ampicillina, cloranfenicolo, tetraciclina, streptomina. Inefficaci risultano sulfonamide, neomicina, acido nalidixico, polimixina e colistina.

Le terapie locali, che danno risultati sempre inferiori, si attuano in caso di insuccesso delle generali, e si praticano preferibilmente con 100-250 mg di tetraciclina due volte al giorno. E' stato anche praticato con un certo successo il trattamento intravaginale con *Lattobacillus acidophilus*. E' questa una terapia che tende a ristabilire il pH acido in vagina ricolonizzando con i lattobacilli. A tale proposito Skarin e Sylwan [92] hanno dimostrato che i lattobacilli vaginali inibiscono *in vitro* la crescita di *G. vaginalis* e di *Mobiluncus*.

La terapia generale con metronidazolo è efficace anche quando *G. vaginalis* e *Mobiluncus* sembrano resistenti *in vitro*. Ciò si può spiegare perché entrambi sono sensibili all'idrossiderivato del farmaco che si forma in vagina; oppure perché, eradicati gli anaerobi sensibili, entrambi vengono eliminati dalle difese immunitarie dell'ospite; o, in alternativa, termina la interdipendenza patogenetica tra gli uni e gli altri. Va tenuto presente che, per il sospetto di mutagenicità e cancerogenicità, il metronidazolo non va prescritto alle gravide fino alla ventesima settimana di gestazione; più oltre va prescritto solo se necessario e sotto stretto controllo medico.

Al partner deve sempre essere somministrata la stessa terapia orale. Assai recentemente è stato proposto l'uso della benzidamina, un antinfiammatorio non-steroidico per la terapia topica supportiva della vaginite da *G. vaginalis* [93].

### *Gardnerella vaginalis*

#### Cenni storici

E' opinione prevalente che il microorganismo ora conosciuto come *Gardnerella vaginalis* sia stato descritto

per la prima volta nel 1953 da Leopold [94], che lo isolò dall'urina e dall'uretra di uomini con segni di prostatite (con o senza uretrite) e da tamponi cervicali delle loro partners sessuali, alcune delle quali erano affette da cervicite. Pur notando l'associazione di questo batterio con prostatite, uretrite e cervicite, questo Autore non gli assegnò un ruolo eziologico definito.

Nel 1954 Gardner e Dukes, in una classica pubblicazione su *Science* [64], furono i primi ad ascrivere a questo batterio un ruolo eziologico quale agente appunto di vaginite non specifica.

Nel 1955 furono pubblicati da Gardner e Dukes i risultati della prima grande rassegna sulla vaginite non specifica [65]. Gli Autori isolarono il batterio nel 92% di 138 donne con perdite vaginali anomale, ma non in 78 donne sane di controllo. In realtà lo stesso Gardner [95] ha fatto notare che prima di Leopold [94] il batterio era stato isolato da altri ricercatori [96, 97], i quali, come Leopold, non assegnarono al microorganismo alcun ruolo eziologico. Amies e Jones [98] inoltre indicarono come un batterio denominato *Haemophilus influenzae* era stato isolato dalle vie genitali femminili nel 1936 da Thompson [99] e dalle vie genito-urinarie nel 1947 da Henriksen [100]. Da questo momento in poi la storia di questo batterio viene in pratica ad identificarsi con le dispute circa la sua posizione tassonomica.

Gardner e Dukes proposero, sulla base delle esigenze nutrizionali del microorganismo [65], il nome di *Haemophilus vaginalis*, finché Lapage nel 1961 [101] non dimostrò che i fattori X e V non erano necessari per la crescita del batterio e suggerì che l'*H. vaginalis* poteva appartenere al genere *Corynebacterium*. Nel 1963 Zinmann e Turner [102], sulla base anche delle caratteristiche morfologiche simili a quelle dei Corinebatteri (presenza di forme a racchetta, disposizione a lettere cinesi, ecc.), proposero ufficialmente l'appartenenza del microorganismo al genere *Corynebacterium*. Poiché non era assimilabile ad altre specie dello stesso genere, proposero anche di chiamare il batterio *Corynebacterium vaginale, sp. nova*.

Nel 1980 Greenwood e Pickett [103] esaminarono con accuratezza la posizione tassonomica di 78 isolati clinici, utilizzando l'analisi adansoniana, l'ibridazione molecolare, la microscopia elettronica, l'analisi biochimica della parete cellulare e altri noti criteri di base. Il loro lavoro ha mostrato due punti fondamentali: 1) i 78 isolati clinici erano molto correlati l'uno all'altro, (similitudine > 95%) e costituivano quindi un'unica specie; 2) le tecniche di ibridazione molecolare escludevano una parentela genetica tra questo batterio ed i generi *Haemophilus* e *Corynebacterium*.

In particolare il batterio era catalasi-negativo, non aveva arabinosio quale componente della parete cellulare, era Gram-negativo o Gram-variabile, non conteneva acido teicoico ed aveva un contenuto di guanina-citosina [103] molto più basso di quello dei Corinebatteri.

Infine, non c'era cross-reattività sierologica tra il genere *Corynebacterium* ed il batterio in questione. Sulla base di tutta l'evidenza disponibile, Greenwood e Pickett [103] proposero la formazione di un nuovo genere, provvisto di un'unica specie, che in onore di Gardner fu denominata *Gardnerella vaginalis*.

Nonostante alcune riserve dello stesso Gardner e di altri, tale denominazione è oggi quella più accettata e corretta.

### Morfologia

Piccoli bastoncini pleomorfi, spesso di forma coccoide, Gram-negativi o Gram-variabili, variabilità che si accentua con l'invecchiamento. Talora sono disposti angolarmente a lettere cinesi, per lo più sono isolati. Negli esami microscopici diretti dei secreti vaginali sembrano punteggiare le cellule epiteliali esfoliate, per la loro capacità di aderire alla superficie citoplasmatica ("clue-cells"). Il numero delle "clue-cells" nei secreti vaginali varia dal 2% al 50% del totale delle cellule vaginali. Non sono mobili, non hanno capsula, non formano spora. L'aspetto microscopico di *G. vaginalis* proveniente da una coltura in terreno solido e colorato col Gram è mostrato in Fig. 2.

### Nutrizione e metabolismo

*G. vaginalis* è un microorganismo nutrizionalmente esigente, ma non necessita per la crescita di nicotinamide-adenina-dinucleotide (NAD) (fattore V) né di emina (fattore X) né di sostanze simil-coenzimatiche [104, 105]. Necessita di biotina, acido folico, niacina, timina, riboflavina e due o più purine e pirimidine [104]. I carboidrati fermentabili migliorano la crescita [104]. Nella Tab. 7 è riportata l'attività riscontrata da Greenwood e Pickett [106] sulla fermentazione degli zuccheri. Nella Tab. 8 sono riportate le caratteristiche generali di *G. vaginalis* [106].

Cresce bene su agar sangue di pecora; non si sviluppa su Mac Conkey né su Thayer-Martin né su 0,01% Tellurite agar [104]. Non riduce i nitriti. E' indolonegativa. Produce acidi dalla fermentazione di destrina, fruttosio, galattosio, glucosio, maltosio, mannosio, ribosio, amido. Non fermenta arbutina, cellobiosio, inositolio, mannitolo, rhamnosio, sorbitolo. Fermenta in maniera variabile lattosio, saccarosio e xylosio [104]. E' anaerobio facoltativo e presenta una temperatura ottimale per la crescita di 35-37 °C. Si sviluppa tuttavia tra 25 e 42 °C [104]. L'optimum di pH per la crescita *in vitro* è 6-6,5; non cresce al di sotto di pH 4 e cresce poco tra pH 4 e 4,5. Provoca  $\beta$ -emolisi su sangue umano e di coniglio. Non emolizza le emazie di pecora [104].

### Coltivazione e isolamento

I primi terreni di isolamento di *G. vaginalis* furono Casman agar, Proteose n. 3 agar con aggiunta di sangue

Tabella 7. - Le reazioni di fermentazione dei carboidrati di *Gardnerella vaginalis* \*

Carboidrati	Risultato del test	Positività (%)
L-Arabinosio	-	9
D-Arabinosio	-	5
Arbutina	-	0
Cellobiosio	-	0
Destrosio	+	97
Destrina	+	100
Fruttosio	+	81
Galattosio	+	96
Inositolo	-	0
Inulina	-	40
Lattosio	-	14
Maltosio	+	100
Mannosio	+	82
Mannitolo	-	0
Melezitosio	-	0
Raffinosio	-	0
Ramnosio	-	0
Ribosio	+	99
Salicina	-	0
Sorbitolo	-	0
Amido	+	100
Sucrosio	-	10
Trealosio	-	4
Xylosio	-	15

\* I dati di fermentazione dei carboidrati sono riferiti a 78 ceppi. Modificata da Greenwood e Pickett [106].

di pecora [65, 94]. In seguito sono stati usati numerosi terreni, come mostra la Tab. 9 [65, 74, 75, 94, 104, 107-113]. I terreni menzionati non sono selettivi; vi crescono anche lattobacilli, anaerobi, altri Gram-positivi e Gram-negativi commensali del tratto genitale ad anche miceti. Anaerobi e Gram-negativi (ad eccezione di *G. vaginalis*) vengono inibiti nello sviluppo dall'aggiunta ai terreni di coltura di colistina e acido nalidixico; i miceti dall'amphotericina B. Le colonie di *G. vaginalis* si distinguono dalle altre perché sono piccole (0,2-0,4 mm), lisce, translucide, tonde, convesse, visibili a luce riflessa e sono circondate da una piccola zona di  $\beta$ -emolisi su agar di sangue umano e di coniglio.

L'emolisi è più chiaramente visibile su HBT agar e HB agar. L'incubazione si effettua in atmosfera al 5-10% di CO<sub>2</sub>. Sono stati anche isolati alcuni stipti strettamente anaerobi; essi sono però così rari (2,8%) che non si raccomanda nella routine l'incubazione in anaerobiosi [103, 104]. L'incubazione, a 37 °C, si protrae per 48 ore, talora per 72 ore. Alcuni Autori hanno riscontrato una stretta correlazione tra l'aspetto microscopico sia a fresco che colorato, con il Gram, ed i metodi di colture [73, 75, 83] mentre altri non hanno rilevato tale correlazione [114-116].

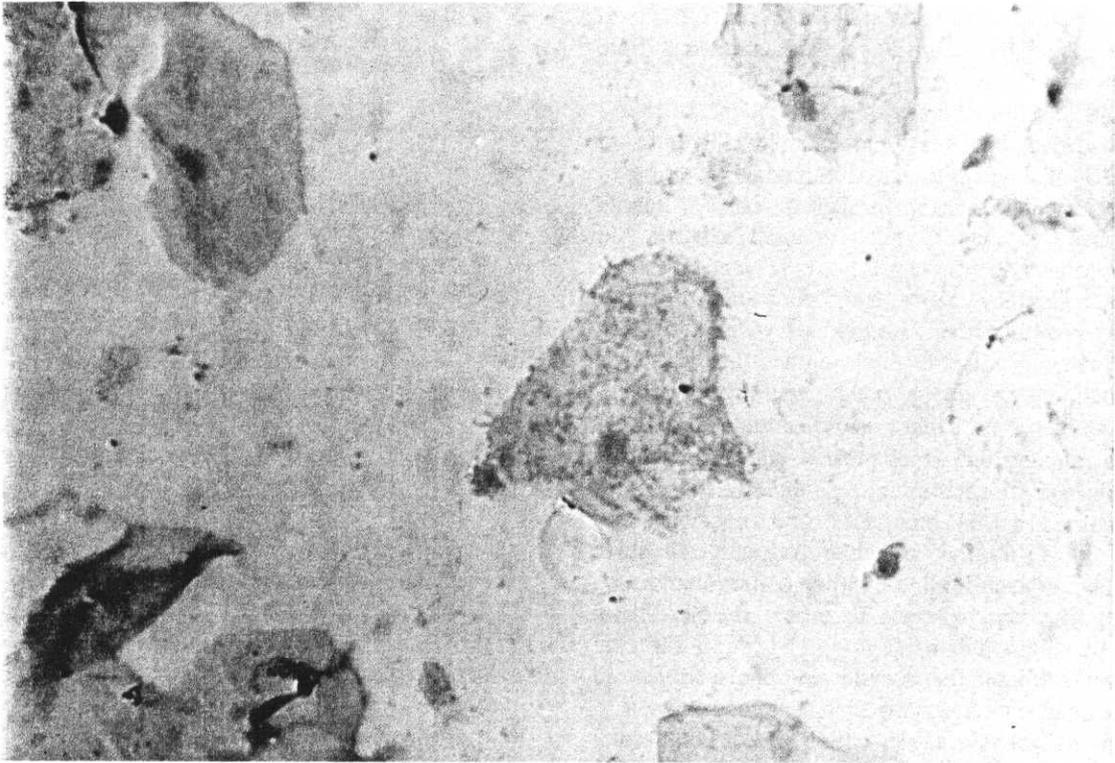


Fig. 1 - Caratteristiche "clue cells" in strisci cervico-vaginali da un soggetto con VNS. Colorazione del Gram (x 120).

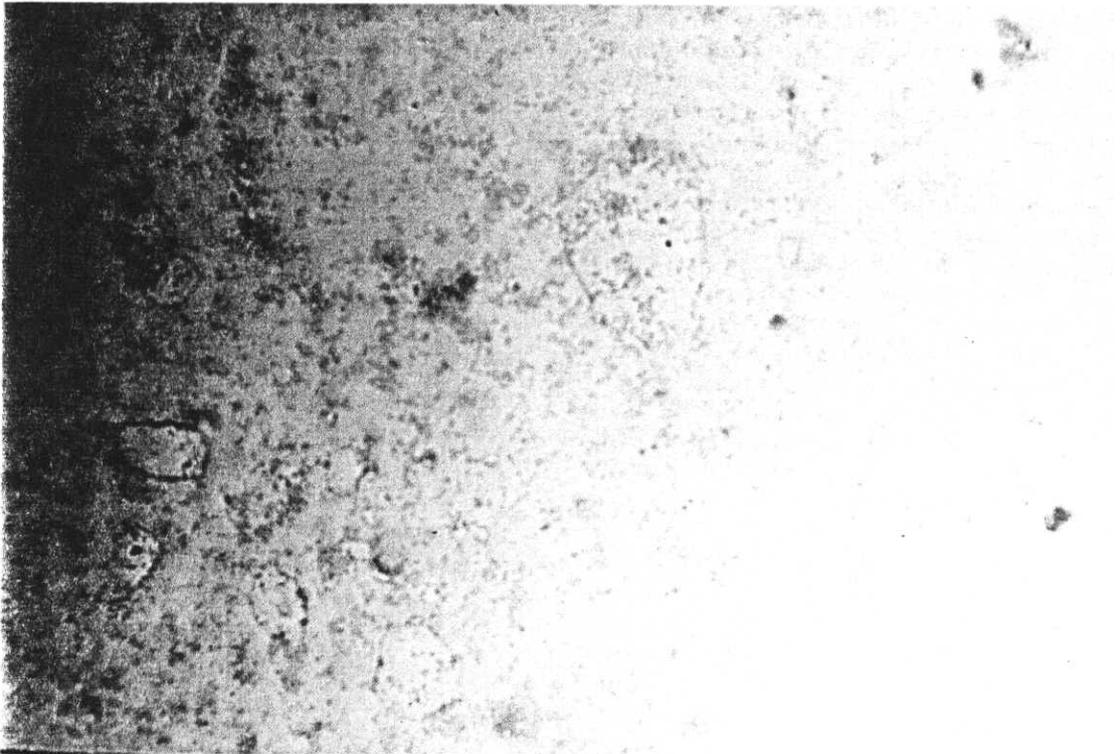


Fig. 2 - Aspetto microscopico di *G. vaginalis* proveniente da una coltura in terreno solido e colorato con il Gram (x 120).

Tabella 8. - *Caratteristiche di Gardnerella vaginalis\**

Test o substrato	Risultato del test	Positività (%)
Ossidasi	-	0
Catalasi	-	0
Indolo	-	0
Ureasi	-	0
ONPG	+	53
Voges-Proskauer	-	0
Acido fenil-piruvico	-	0
Lipasi	+	43
Idrolisi di:		
Ippurato	+	92
Tributirina	-	0
Tween 80	-	0
Caseina	-	0
Amido	+	100
Esculina	-	0
Gelatina	-	0
Crescita a:		
pH 4	-	0
pH 8	+	95
25 °C	+	85
30 °C	+	100
42 °C	+	100
NO -- NO	-	0
Emolisi di:		
Sangue umano	+	96
Sangue di pecora	-	0
Decarbossilazione di:		
Lisina	-	0
Omitina	-	0
Gluconato	-	0
Lecitinasi	-	0
Crescita su terreno selettivo:		
Tellurite (0,01%) agar	-	0
Cloruro di sodio (3%) agar	-	0
Bile (1%) agar	-	0
Rogosa agar	-	0
Mac Conkey agar	-	0
Thayer-Martin agar	-	0

\* I dati delle relazioni biochimiche sono basati su 78 ceppi. Modificata da Greenwood e Pickett [106].

Terreno di trasporto: Proteose Peptone n. 3 all'1,5% in acqua distillata: dispensare 2 ml in screw-cap tubes [117].

Terreno di mantenimento: Proteose Peptone n. 3 all'1,5% in acqua distillata con agar 0,8% [117].

Terreno per fermentazioni: Proteose Peptone n. 3,2%; agar 0,5%; bromocresolo (16% dye in ethylalcohol), 1 ml per litro; carboidrato 1% [117].

#### Identificazione

Il maggior problema è differenziare *G. vaginalis* dai "corineformi" o "difteroidi". Vengono raccomandati i seguenti tests: morfologia delle colonie su agar-peptone-

amido-destrosio e osservazione microscopica [117]; sensibilità a sulfonamide e metronidazolo; beta-emolisi con agar-sangue umano ma non con agar-sangue di pecora. L'idrolisi dell'ippurato, la reazione della lipasi e la formazione di acidi dai carboidrati hanno ancora bisogno di essere meglio standardizzate nelle tecniche. I laboratori clinici possono identificare presuntivamente *G. vaginalis* mediante l'aspetto delle colonie, la  $\beta$ -emolisi con sangue umano, la prova negativa della catalasi e la presenza di "clue-cells" negli strisci vaginali colorati col metodo di Gram. I laboratori che hanno invece interesse specifico nel campo delle infezioni vaginali e che devono identificare batteri anche extragenitali, hanno bisogno di ulteriori prove, quali i tests delle  $\alpha$  e  $\beta$ -glucosidasi, l'idrolisi dell'amido e dell'ippurato, la sensibilità alla sulfonamide e metronidazolo, l'ossidasi, l'inibizione da perossido di idrogeno al 3% e la produzione di acidi da glucosio, maltosio, amido [117]. L'analisi gascromatografica può dare informazioni addizionali, quali l'elevato tenore di acetato rispetto al tenore di lattato. La Tab. 10 riporta i tests più comuni ed utili per la identificazione presuntiva o definitiva di *G. vaginalis*.

Recentemente, è stata proposta una tecnica di immuno-fluorescenza diretta per la diagnosi in sito di *G. vaginalis*. Questa tecnica appare più sensibile dell'isolamento e l'identificazione microbiologica [118].

#### Antigeni e risposta immunitaria

La letteratura internazionale non riporta molti studi circa la composizione antigenica di *G. vaginalis*.

Nel 1974 Smaron e Vice [119] hanno mostrato la presenza di un determinante antigenico comune in tutti i ceppi di *G. vaginalis* isolati; la tecnica usata era la immunodiffusione. Più recentemente Boustouller *et al.* [120] hanno identificato i componenti antigenici di *G. vaginalis* con l'analisi in western blot; è stata riscontrata una certa variabilità fra i polipeptidi immunogenici di vari ceppi, ma tutti i 23 ceppi studiati avevano un antigene comune di peso molecolare pari a 41 kDa. Lo stesso antigene non è stato trovato in alcuno dei seguenti batteri: Corineformi non classificati, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter foetus*, *Campylobacter jejuni*, *Bacteroides urealyticus*.

Nel 1962 Edmunds [105] aveva distinto sette gruppi sierologici diversi di *Haemophilus vaginalis* mediante tests di precipitazione. Studiando il fenomeno della opsonizzazione, Easmon *et al.* [121] constatarono che gli antisieri di coniglio preparati per l'immunofluorescenza, non avevano lo stesso effetto su tutti i ceppi di *G. vaginalis*. Secondo gli Autori questa via può essere la base per un migliore studio di sierotipizzazione di *G. vaginalis*.

#### Potere patogeno, virulenza e ruolo eziopatogenetico della *G. vaginalis*

Nel 1955 Gardner e Dukes [65] misero in evidenza il ruolo causale della *G. vaginalis* nella vaginite non specifica, dimostrando come in questa infezione venis-

Tabella 9. - Terreni di coltura usati per l'isolamento di *Gardnerella vaginalis*

Terreno	Tipo di sangue	Selettivo	Differenziale
Casman agar [94]	pecora	-	-
Proteose no. 3 agar [65]	pecora	-	-
Digest agar with maltose [107]	uomo	-	+
Dextrose starch agar [108]	-	-	-
Peptone starch dextrose agar [104]	-	-	-
Starch dextrose agar with purple broth base [109]	-	-	±
Columbia colistin-nalidixic acid agar [110]	-	-	±
Beef infusion [74]	-	±	-
V agar (Columbia agar + proteose peptone no. 3) [111]	pecora	-	-
CNA GC agar + com starch + Isovitalex [112]	uomo	-	+
Starch serum agar [75]	-	±	+
Chocolate agar [75]	-	-	±
HBT agar [113]	pecora	-	-
	uomo	±	+

Modificata da Piot e Van Dyck [117].

Tabella 10. - Identificazione presuntiva di *Gardnerella vaginalis*: test raccomandati

Test o substrato	Risultato del test	Positività (%)
Ossidasi	-	0
Catalasi	-	0
Emolisi di:		
sangue umano	+	96
sangue di pecora	-	0
Idrolisi dell'ippurato	+	92

Modificata da Greenwood e Pickett [106].

sero esaurientemente soddisfatti i postulati di Koch. Gli Autori fornirono una ulteriore prova della patogenicità del microorganismo sia provocando l'infezione nel 73% di donne volontarie adulte e sane inoculate in vagina con materiale prelevato dalla vagina di donne affette, sia isolando il batterio dall'uretra dei partners sessuali di donne con vaginite non specifica recidivante.

Ciononostante la patogenicità di questo microorganismo è stata notevolmente discussa. Mentre numerosi Autori oltre a Gardner e Dukes, quali Brewer *et al.* [122], Gray *et al.* [123], Criswell *et al.* [124], Levison *et al.* [125], sostenevano la tesi della patogenicità del batterio, altri Autori, quali Heltai *et al.* [126], Frampton *et al.* [127], Gordon *et al.* [128], McCormack *et al.* [74] non accettavano un preciso ruolo eziopatogenetico del microorganismo nella vaginite non specifica, considerandolo unicamente un batterio commensale od un ospite di passaggio nella flora vaginale con potenzialità

di causare vaginite solamente in alcune particolari circostanze predisponenti.

Criswell *et al.* [124] inocularono nella vagina di volontarie sane una coltura pura di *G. vaginalis*, ottenendo il 50% di infezioni. Hammerschlag *et al.* [46] hanno riscontrato nelle pareti vaginali una debole risposta infiammatoria locale con infiltrati di polimorfonucleati; ed hanno concluso per una sia pur bassa virulenza diretta di *G. vaginalis*. Rein [129] sostiene che le donne che non si ammalano non hanno sulle cellule epiteliali vaginali i recettori per la *G. vaginalis*. Frampton *et al.* [127] suggeriscono che *G. vaginalis* è un commensale della vagina e che in alcune circostanze può causare vaginiti. Tarlington e D'Abbrera [130] considerano *G. vaginalis* quale un vero parassita delle cellule vaginali, che provoca accelerata esfoliazione delle cellule intermedie cariche di glicogeno (come il *Trichomonas vaginalis*). *G. vaginalis* è stata associata anche a setticemie, sepsi neonatali, morbilità puerperale e sepsi post-abortiva [131-135], infezioni del tratto urinario [136] e della prostata [94]. Negli anni recenti ha raccolto un consenso generale l'opinione che *G. vaginalis* abbia un ruolo causale nel determinare la VNS.

D'altra parte va ricordato che in donne "asintomatiche" i tassi di isolamento riportati variano ampiamente dalla negatività del reperto microbiologico sino al 47% (Tab. 11) [65, 74, 75, 114, 115, 125, 137-145]. Questi dati si possono spiegare con l'uso di tecniche diverse di coltura, con indagini effettuate su diversi tipi di popolazioni femminili e con la assenza di una definizione uniforme dei casi e, soprattutto, dei criteri diagnostici usati per definire la vaginite non specifica [145].

Secondo Levison *et al.* [125] non vi è alcuna differenza nella conta di *G. vaginalis* tra le donne con vaginite non specifica e donne asintomatiche con modeste o con abbondanti secrezioni vaginali. Totten *et al.* [113] dimostrò con terreni selettivi al sangue come la presenza di *G. vaginalis* nelle secrezioni vaginali potesse arrivare fino al 68% nelle donne sane.

Tabella 11. - Prevalenza di *Gardnerella vaginalis*

Autore	Data	Pazienti asintomatiche (%)	Pazienti sintomatiche (%)
Gardner [65]	1955	0	92 (a)
Dunkelberg [137]	1961	0	34
Dunkelberg [138]	1962	13,8	-
Mendel [139]	1965	33	67
Lewis [140]	1971	10,4	44
Akerlund [141]	1974	0	31,4 (a)
Josey [142]	1976	13	55
McCormack [74]	1977	31	33
Smith [115]	1977	47	50
Levison [125]	1977	40	-
Pheifer [75]	1978	80 (a) 10 (b)	91 (a) 0 (b)
Levison [114]	1979	80 (c) 57 (d)	42 (c)
Amsel [143]	1983	40	96
Admad [144]	1985	2	97,83
Ceddia [145]	1986	2	31,2

(a) Con alcuni reperti obiettivi.

(b) Senza reperti obiettivi.

(c) Con leucorrea profusa.

(d) Senza leucorrea profusa.

Modificata da Vontver ed Eschenbach [1].

Sicuramente il fattore che crea discrepanze e confusione nella eziologia della VNS è la concomitante presenza in questa infezione di altri microorganismi.

Già Gardner e Duker nel 1955 avevano segnalato come in donne affette da VNS si potessero isolare *Trichomonas vaginalis* e *Candida albicans*.

Brewer *et al.* [122] isolarono *G. vaginalis* dal 42% delle donne con perdite vaginali e questi Autori riportarono inoltre il frequente isolamento di altri microorganismi insieme alla *G. vaginalis* nel secreto vaginale di donne affette da VNS. Per cui nonostante *G. vaginalis* sia il microorganismo più comune isolato ed il batterio presente in più alte concentrazioni nelle donne con VNS, viene oggi riconosciuta la possibilità di isolare microorganismi multipli insieme ad esso. Infatti un'ampia varietà di microorganismi sia aerobi che anaerobi sono stati isolati dalla flora vaginale normale [42, 125] da pazienti con VNS ed infezioni da *G. vaginalis* [126]; per cui non si può più affermare che solamente la *G. vaginalis* è presente nel secreto di donne affette da VNS. In particolare Heltai e Taleghany [126] non isolarono mai la *G. vaginalis* da donne affette da VNS senza isolare anche altri microorganismi.

L'uso di tecniche di coltura più sofisticate per l'isolamento degli anaerobi dalla vagina di donne sia sintomatiche che asintomatiche è stato recentemente passato in rassegna da Larsen e Galask [32]. Con tali tecniche Gorbach *et al.* [42] isolarono batteri sia aerobi che anaerobi nel 97% di prelievi cervicali di donne sane.

Secondo Pheifer *et al.* [75] e Chen *et al.* [76], vi sarebbe una relazione di simbiosi tra *G. vaginalis* ed altri batteri della vagina, particolarmente gli anaerobi, in donne con infezione vaginale da *G. vaginalis*. In tali donne si ha un aumento fino a 10 volte del numero degli anaerobi in vagina; ed un'ampia varietà di microor-

ganismi aerobi ed anaerobi sono stati isolati sia dalla flora vaginale normale che da pazienti con vaginite da *G. vaginalis* [32].

In particolare *G. vaginalis* è stata isolata nel 44% delle donne gravide con VNS e nel 10% delle asintomatiche [32]. Altri Autori riportarono ugualmente tassi di isolamento da donne gravide dal 10,6% al 39% e dal 13,3% al 43% [65, 113, 125, 134]. In molti di questi studi venivano usate buone tecniche di coltura e tecniche sofisticate di isolamento per gli anaerobi [113, 125, 135]. Da altri Autori [126] è stato invece dimostrato come il tasso di isolamento nelle donne gravide sia superiore a quello delle donne non gravide.

Questa differenza dei tassi di isolamento nei vari gruppi di popolazione studiati, in particolare il suo isolamento da donne sintomatiche e asintomatiche, ha posto il problema se considerare o meno la *G. vaginalis* un microorganismo patogeno oppure un commensale occasionalmente presente nella flora vaginale. Rein [129] ipotizza che esistano ceppi "virulenti" e ceppi "avirulenti": in tal modo le donne sintomatiche sarebbero infettate da ceppi virulenti mentre le donne asintomatiche sarebbero colonizzate dal germe avirulento anche perché le cellule epiteliali vaginali di queste ultime sono prive dei recettori specifici.

Inoltre il meccanismo di sinergia con gli anaerobi, indispensabile all'infezione secondo questo Autore, nelle donne asintomatiche sarebbe carente. La patogenicità della *G. vaginalis* è stata dimostrata in modo evidente nello studio di Criswell *et al.* [124], che inoculò il germe in coltura pura nella vagina di donne volontarie adulte e sane: in più del 50% si instaurò l'infezione con i classici segni; mentre il microorganismo non fu mai isolato dalle donne le cui secrezioni vaginali rimanevano normali.

E' determinante ai fini dell'instaurazione dell'infezione anche la concentrazione, cioè il numero di unità formanti colonia per ml di secreto vaginale. Secondo Eschenbach [146] nelle donne con vaginite da *G. vaginalis* sono presenti più di  $10^7$  CFU/ml.

Un fattore di notevole importanza nella virulenza di *G. vaginalis* potrebbe essere la forte capacità adesiva che ha il batterio sulle cellule epiteliali, come esemplificato dalle "clue-cells" vaginali. Il batterio possiede [147] delle "adesine" di natura proteica espresse probabilmente dai "pili", strutture filamentose osservate in microscopia elettronica sui ceppi di fresco isolamento clinico [148]. E' da notare infine che *G. vaginalis* può essere isolata anche da siti corporei extravaginali (sangue, endometrio, tratto urinario, sperma, ecc.) in particolare durante o dopo il parto [149].

### Epidemiologia

E' da considerare in una qualsiasi indagine epidemiologica che le popolazioni studiate sono difficilmente inquadrabili con esattezza. Infatti l'apprezzamento e la valutazione di alcuni segni caratteristici di malattia sono spesso soggettivi e i questionari confidenziali non sono del tutto attendibili. Ciò spiega, insieme ad altri fattori,

la grande variabilità riportata circa il "carriage" di *G. vaginalis* riscontrato dai vari Autori (Tab. 11).

Ciononostante numerosi studi, a cominciare da quello di Gardner e Dukes nel 1955, indicano che la vaginite da *G. vaginalis* è una malattia trasmessa per via sessuale [65, 150, 151]. Indagini epidemiologiche hanno evidenziato come l'infezione sia più frequente nelle popolazioni femminili ad attività sessuale promiscua [137, 150, 151]. Secondo Gardner e Kaufman [71] l'infezione è presente nel 10-15% delle donne adulte sposate, nel 50% delle donne adulte con attività sessuale promiscua e fino a 60% nelle prostitute. Sarebbe inoltre più frequente secondo alcuni Autori nelle donne di razza negra [74, 138, 140, 142, 152].

E' inoltre associata con altre malattie trasmesse per via sessuale quali la gonorrea e la tricomoniasi [142, 153]. Secondo McCormack *et al.* [74] sarebbe anche associata a gravidanze pregresse e all'uso di contraccettivi orali [74, 142]. D'altra parte va rilevato che la *G. vaginalis* raramente è stata isolata dalla vagina delle bambine prima del menarca: Kummel e Ritzerfeld [154] nella loro casistica di 65 bambine non isolarono mai il microorganismo, a differenza di Hammerschlag *et al.* [46] che lo isolarono da circa il 14% di bambine di età compresa tra i 2 mesi e i 15 anni, la maggior parte delle quali senza leucorrea. Dalle donne apparentemente vergini il microorganismo non è stato isolato: Karpovskaya [155] non lo isolò da 68 giovani donne prive di esperienze sessuali.

L'infezione da *G. vaginalis* avviene quindi, come già detto, unicamente per via sessuale; sorgenti autogene di infezione sono rare ed il microorganismo non è stato mai isolato dal cavo orale. Che *G. vaginalis* sia trasmessa per via sessuale è stato dimostrato anche da Chattopadhyay e Teli [151], i quali isolarono il microorganismo più frequentemente tra le donne sessualmente attive in età compresa tra i 16 e i 40 anni. Come già riferito in altro capitolo, il microorganismo fu isolato dall'urina [94] e dall'uretra [99] di partners sessuali di donne affette. Gardner e Dukes [65] lo isolarono in 91 dei 101 consorti di donne infette senza che tali consorti notassero segni di malattia. Successivamente fu investigato l'apparato genito-urinario maschile quale "serbatoio" del microorganismo. Kinghorn *et al.* [156] studiò 194 uomini non selezionati e riscontrò un tasso di isolamento per *G. vaginalis* del 7,2%; l'isolamento risultava caratteristicamente molto più alto dal prepuzio che non dall'uretra, specie in soggetti con balanopostite non da *Candida*. Con *G. vaginalis* venivano isolate anche specie di *Bacteroides*, che avrebbero un ruolo patogenetico concausale nell'infezione. L'isolamento del batterio maggiore dal prepuzio o dal glande che non dall'uretra è indicativo di come tale microorganismo sia assai poco responsabile, di uretriti nell'uomo, essendo infatti facilmente eliminato dall'uretra maschile con l'atto della minzione [156]. Si può concludere dicendo che è possibile il ruolo di "carriers" anche da parte di uomini asintomatici. Un'alta incidenza di reinfezione si

verifica in donne trattate i cui partners sessuali non vengono a loro volta sottoposti a terapia.

#### *Sensibilità ai chemioterapici*

*G. vaginalis* mostra *in vitro* notevole sensibilità ai più comuni chemioterapici usati in ginecologia. Mostra invece resistenza ai farmaci più usati nelle infezioni delle vie urinarie (acido nalidixico, sulfametossazolo). E' sensibile a penicillina, cefoxitina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina, gentamicina, tiamfenicolo. Circa la sensibilità al metronidazolo, rari ceppi sono stati trovati resistenti, specialmente tra le varianti più lunghe (3-4 microns). I metodi usati non sembrano influenzare i risultati. L'idrossiderivato del metronidazolo è consistentemente più attivo [157] e questo spiega la migliore azione che il metronidazolo svolge *in vivo* rispetto alle prove di laboratorio, in quanto *in vivo* viene trasformato nel suo idrossiderivato. Il metronidazolo è largamente attivo verso tutti i microorganismi con prevalente metabolismo non ossidativo (v. anaerobi).

#### **Esperienza degli Autori sull'isolamento di *G. vaginalis* in pazienti ambulatoriali in Italia**

##### *Metodi*

*Popolazione studiata.* - Sono state sottoposte a indagine 1212 donne di età compresa fra 16 e 65 anni afferenti al Centro di Citodiagnostica Ginecologica dell'Università dell'Aquila per un programma di screening dei tumori dell'apparato genitale femminile. Nessuna donna era stata sottoposta a terapia antibiotica da almeno 30 giorni prima dell'esame e del prelievo cervico-vaginale.

Meno del 10% dei soggetti usavano regolarmente sistemi contraccettivi (IUD, diaframma o creme spermicide). E' stato sottoposto alle donne un questionario confidenziale al fine di raccogliere e di classificare tutte le informazioni cliniche oggettive e soggettive rilevanti. Durante la visita ginecologica venivano eseguiti da ciascuna donna due prelievi dai fornicci vaginali posteriori con due tamponi di cotone.

Il primo tampone veniva immerso in 0,5 ml di soluzione fisiologica e strisciato per l'esame microscopico. Dopo lo striscio, il medesimo tampone veniva immerso in una soluzione di KOH al 10% e odorato per il test delle amine. Il test veniva eseguito sempre da un unico operatore. Il secondo tampone veniva usato per effettuare la coltura. Inoltre durante l'esame il ginecologo misurava il pH del secreto vaginale usando striscie Pamphea (fornite dalla Ditta Riedel de Haen, Koblenz, W.G.).

*Esame microscopico.* - E' stato effettuato sia "a fresco" sia dopo colorazione con il Gram. Gli esami microscopici venivano eseguiti per evidenziare le caratteristiche "clue-cells" e tutti gli altri aspetti morfologici della flora microbica vaginale.

*Coltura e identificazione della G. vaginalis.* - Il microorganismo veniva isolato in Columbia Agar Base (Oxoid, U.K.) con supplemento selettivo (Oxoid) e sangue defibrinato di cavallo 10% (Sclavo). Il terreno veniva incubato in capsule di Petri a 37 °C, in atmosfera al 7% CO<sub>2</sub> per 48 ore. Ogni colonia che presentava emolisi e altri aspetti morfologici tipici di *G. vaginalis* veniva sottoposta ai seguenti tests: ossidasi, catalasi, capacità di emolizzare il sangue umano, idrolisi dell'amido e ippurato, suscettibilità al metronidazolo (50 mg), al trimetoprim (1,25 mg) e alla sulfonamide (1 mg). Tutte le identificazioni venivano confermate in successive sub-colture.

*Definizioni cliniche.* - Ogni donna con perdite vaginali associate o meno a flogosi e/o prurito veniva diagnosticata come paziente affetta da vaginite. La diagnosi differenziale di vaginite non specifica (VNS) era basata sulla presenza di almeno 3 dei seguenti segni o sintomi:

- pH > 4,5;
- test delle amine positivo;
- presenza delle caratteristiche cellule epiteliali vaginali con batteri adesi al citoplasma ("clue-cells");
- perdita bianca o bianco-grigiastra aderente alle pareti vaginali, viscosa, omogenea.

Questi parametri clinici seguono le indicazioni suggerite dalla maggior parte degli Autori (vedi "Diagnosi clinica" nel capitolo "La vaginite cosiddetta non specifica").

## Risultati

*Prevalenza della G. vaginalis.* - Fra le 1212 donne ammesse allo studio *G. vaginalis* è stata isolata da 82 pazienti, con un tasso di prevalenza del 67,6 per 1000.

In 57 casi positivi per *G. vaginalis* veniva diagnosticata VNS, mentre in 15 casi vi era vaginite da altra eziologia e 10 casi erano donne sane.

La prevalenza totale della VNS nel periodo considerato per l'ammissione allo studio era di 141 (tasso per 1000) mentre la prevalenza di VNS con associato isolamento di *G. vaginalis* era molto minore (47 per 1000,  $p < 0,01$ ).

Dai dati nella Tab. 12 si vede che la VNS rappresenta più del 20% di tutti i casi di vaginite nella popolazione studiata. Nell'insieme *G. vaginalis* è stata isolata solamente da un terzo di tutti i casi diagnosticati di VNS.

La distribuzione per età dei soggetti *G. vaginalis* positivi e il suo possibile rapporto con la presenza o assenza di patologia vaginale è stata anche studiata.

Dalla valutazione globale dei dati ottenuti si è potuto osservare che in nessun gruppo di età il tasso di isolamento di *G. vaginalis* nelle donne affette da VNS era significativamente lontano dal 33,3%. Ugualmente la prevalenza di VNS (associata o no con l'isolamento di *G. vaginalis*), non era diversa nei 3 gruppi d'età premenopausale.

Tuttavia la prevalenza di VNS era molto più bassa nelle donne in postmenopausa rispetto a quelle in pre-

menopausa (tasso per 1000: 167 e 88, rispettivamente;  $p < 0,01$ ).

Dopo la menopausa si osservava inoltre uno spiccato aumento nel tasso di "carriage" di *G. vaginalis* in donne sane con l'aumentare dell'età. Il basso numero di isolati impediva tuttavia ogni analisi statistica di questi dati.

*Correlazioni clinico-microbiologiche.* - Il relativo alto numero (circa 2 terzi di tutti i soggetti) di VNS senza isolamento dell'agente causale nella popolazione femminile in studio ci ha indotti a investigare maggiormente il rapporto tra i diversi segni/sintomi con i quali la VNS è definita e l'isolamento di *G. vaginalis*.

La Tab. 13 mostra che le VNS "*G. vaginalis*-positive" erano caratterizzate da un'alta frequenza di tutti i 4 sintomi considerati nei metodi cioè test delle amine, perdita omogenea, pH > 4,5 e presenza di "clue-cells".

È interessante tuttavia che i 2 ultimi segni e non i primi 2 venivano frequentemente riportati dalle pazienti non affette da VNS (66,6% per le "clue-cells" e 86,6% per il pH > 4,5). In particolare (Tab. 14), la frequenza del segno pH > 4,5 era alta nelle pazienti affette da VNS così come nelle pazienti affette da altre forme di vaginite.

Nelle donne affette da VNS, era la presenza o assenza di "clue-cells" l'elemento che consentiva la diagnosi differenziale da altre forme di vaginite (89,5 contro 2,2% rispettivamente) e il test delle amine (83% contro 0,6% rispettivamente).

## Discussione

L'isolamento microbiologico della *G. vaginalis* in pazienti ambulatoriali con diagnosi di VNS varia grandemente nella letteratura internazionale, da valori estremi del 90% riportati da Gardner e Dukes [65] a circa il 30% riportato da altri Autori [74, 85, 137, 142, 145]. Nel nostro gruppo di pazienti il tasso di isolamento di *G. vaginalis* era in accordo con i valori più bassi, e ciò in soggetti che presentavano tutti i segni ed i sintomi caratteristici della malattia, diagnosticata secondo la maggioranza dei ricercatori. Questo fatto è stato criticamente discusso da vari Autori [41, 143].

Certamente, la difficoltà di crescita in coltura del microorganismo può essere una ragione per una associazione clinico-microbiologica debole. D'altra parte devono essere considerati altri fattori, come riportato da Taylor *et al.* [41]. I dati nella Tab. 14 dimostrano che 2 dei segni considerati tipici nella definizione di VNS, cioè il pH > 4,5 e la perdita omogenea, in realtà non sono tipici della VNS essendo ugualmente presenti anche in altre vaginiti a eziologia diversa. Uno dei due (pH > 4,5) sembra essere frequente anche in donne sane.

Inoltre "clue-cells" e pH > 4,5 sono stati frequentemente trovati in soggetti *G. vaginalis*-positivi che non potevano essere considerati affetti da VNS a causa della negatività del test delle amine e l'assenza di perdite.

Tabella 12. - *Isolamento di Gardnerella vaginalis*

Clinica	N. soggetti esaminati	Totale (%)	Positivi per <i>G. vaginalis</i>	Positivi nella situazione clinica considerata (%)
Donne con VNS	171	14,1	57	33,3
Donne senza VNS	1041	85,9	25	2,4
a) altre vaginiti	703	58	15	2,1
b) adulte sane	338	27,8	10	2,9
Totale	1212		82	6,8

Diagnosi di VNS posta secondo i criteri classici restrittivi (presenza di almeno tre dei quattro segni).

Tabella 13. - *Correlazione fra presenza di Gardnerella vaginalis e segni caratteristici di VNS*

Positivi per <i>G. vaginalis</i> (n. casi 82)	Perdita omogenea	Test delle amine positivo	"Clue-cells"	pH > 4,5
VNS (n. casi 57)	48 (84,2%)	40 (70,1%)	50 (87,7%)	56 (98,3%)
Altre vaginiti (n. casi 15)	4 (26,2%)	0	10 (66,6%)	13 (86,6%)

Tabella 14. - *Correlazione dei quattro caratteristici segni nelle donne con VNS, con altre vaginiti e nelle donne sane*

Gruppi	Perdita	Test delle amine positivo	"Clue-cells"	pH > 4,5
VNS (n. casi 171)	156 (91,2%)	142 (83%)	153 (89,5%)	165 (96,5%)
Altre vaginiti (n. casi 703)	426 (60,6%)	4 (0,6%)	15 (2,2%)	671 (95,5%)

La soggettività di alcuni dei criteri per la diagnosi clinica di VNS è stata già evidenziata quale causa di diagnosi incerta. Considerato quindi che alcuni dei segni sono non-specifici, è necessario porre diagnosi di VNS con criteri ben definiti. I nostri dati mettono in evidenza che il test delle amine e la presenza di "clue-cells" sono fondamentali e sono gli unici criteri veramente discriminanti per la diagnosi differenziale della VNS rispetto ad altre vaginiti.

Un dato interessante della nostra indagine è l'aumentato "carriage" di *G. vaginalis* (non associato a VNS) con l'aumentare dell'età. Infatti nelle donne in pre-menopausa non vi è praticamente "carriage" di *G. vaginalis* (solamen-

te 2 casi su 51) mentre in postmenopausa il "carriage" era di 8 su 20 donne ( $p < 0,001$ ). Questo fatto, unito alla bassa frequenza di VNS in età postmenopausale, indicherebbe che *G. vaginalis* non è in grado di agire come patogeno in un ambiente vaginale caratterizzato da fattori ormonali e microbiologici peculiari quale quello della donna in post-menopausa. Si potrebbe ipotizzare che in tale ambiente l'assenza o la piccola quantità di glicogeno nelle cellule epiteliali non predisponga al potenziale aggressivo di *G. vaginalis*.

Ricevuto il 18 maggio 1988.  
Accettato il 6 giugno 1988.

## BIBLIOGRAFIA

1. VONTVER, L.A. & ESCHENBACH, D.A. 1981. The role of *Gardnerella vaginalis* in non specific vaginitis. *Clin. Obstet. Gynecol.* **24**: 439-460.
2. JONES, B.M. 1983. *Gardnerella vaginalis*-associated vaginitis - a "new" sexually transmitted disease. *Med. Lab. Sci.* **40**: 53-57.
3. BROWN, D., KAUFMAN, R.H. & GARDNER, A.L. 1984. *Gardnerella vaginalis* vaginitis. The current opinion. *J. Reprod. Med.* **29**(5): 300-306.
4. CHATTOPADHYAY, B. 1984. The role of *Gardnerella vaginalis* in "non-specific" vaginitis. *J. Infect. Dis.* **9**: 113-125.
5. ABRAMS, G.D. & BISHOP, J.E. 1966. Effect of the normal microbial flora on the resistance of the small intestines to infection. *J. Bacteriol.* **92**: 1604-1608.
6. BAHNHOF, M., MILLER, C.P. & MARTIN, W.R. 1964. Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental salmonella infection. I. Factors which interfere with the initiation of infection by oral inoculation. *J. Exp. Med.* **120**: 805-816.
7. FRETER, R. 1962. *In vivo* and *in vitro* antagonism of intestinal bacteria against *Shigella flexneri*. I. The inhibitory mechanism. *J. Infect. Dis.* **110**: 38-46.
8. KENNEDY, M.J. 1981. Inhibition of *Candida albicans* by the anaerobic oral flora of mice *in vitro*. *Sabouraudia.* **19**: 205-208.
9. MEYNELL, G.G. 1963. Antibacterial mechanisms of the mouse gut. *Br. J. Exp. Pathol.* **44**: 209-219.
10. VAN DER WAAIJ, D. & BERGHUIS, J.M. 1974. Determination of the colonization resistance of the digestive tract of individual mice *J. Hyg. (London)* **72**: 379-387.
11. PAAVONEN, J. 1983. Physiology and ecology of the vagina. *Scand. J. Infect. Dis.* **40**(Suppl.): 31-35.
12. MOGHISSI, R.S. 1979. Vaginal fluid constituents. In: *The biology of the fluids of the female genital tract*. F.K. Beller & G.F.B. Schumacher (Eds). Elsevier, North Holland, Inc. Amsterdam. 13 p.
13. PERL, J.L., MILLES, G. & SCHIMOZATO, Y. 1959. Vaginal fluid subsequent to panhysterectomy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **78**: 285-287.
14. MASTER, W.H. & JOHNSON, V.E. 1974. *Human sexual response*. Little Brown, Boston 1966. p. 68.
15. ODEBLAD, E. 1976. The biophysical aspects of cervical mucus. In: *The cervix*. J.A. Jordan & A. Singer (Eds). W.B. Saunders Co., London. pp. 155-159.
16. GROSS, M. 1961. Biochemical changes in the reproductive cycle. *Fertil. Steril.* **12**: 245-262.
17. SINGH, E.J. & SWARTWOUJ, J.R. 1972. Human cervical mucus lipids. *J. Reprod. Med.* **8**: 35-39.
18. PRETI, G. & HUGGINGS, G.R. 1975. Cyclical changes in volatile acid metabolites of human vaginal secretions and their relation to ovulation. *J. Chem. Ecol.* **1**: 361-366.
19. HUGGINS, G.R. & PRETI, G. 1981. Vaginal odors and secretions. *Clin. Obstet. Gynecol.* **24**: 355-377.
20. RAFFI, R.O., MOGHISSI, K.S. & SACCO, A.G. 1977. Proteins of human vaginal fluid. *Fertil. Steril.* **28**: 1345-1350.
21. PRETI, G. & HUGGINGS, G.R. 1978. Organic constituents of vaginal secretions. In: *The human vagina*. E.S.E. Hafez & T.N. Evans (Eds). Elsevier, North Holland, New York.
22. BEHRMAN, S.J. & LIEBERMAN, M.E. 1973. Biosynthesis of immunoglobulin by the human cervix. In: *The biology of the cervix*. R.J. Blandeu & K. Moghissi (Eds). University of Chicago Press, Chicago. p. 235.
23. MICHAEL, R.P. 1972. Determinants of primate reproductive behaviour. *Acta Endocrinol. Suppl.* **166**: 322-363.
24. MICHAEL, R.P., KEVERNE, E.B. & BONSALE, R.W. 1971. Pheromones: isolation of male sex attractants from a female primate. *Science* **172**: 964-966.
25. MICHAEL, R.P., ZUMPE, D., KEVERNE, E.B. & BONSALE, R.W. 1972. Neuroendocrine factors in the control of primate behaviour. *Recent Prog. Horm. Res.* **28**: 665-706.
26. MICHAEL, R.P. & KEVERNE, E.B. 1968. Pheromones in the communication of sexual status in primates. *Nature* **218**: 746-749.
27. MICHAEL, R.P., BONSALE, R.W. & WARNWER, P. 1974. Human vaginal secretions: volatile fatty acid content. *Science* **186**: 1217-1219.
28. DÖDERLEIN, A. 1892. Das Scheidensekret und Seine Bedeutung für Puerperalfieber. *Zentralbl. Bakteriol.* **11**: 699-705.

29. CRUICKSHANK, R. & SHARMAN, A. 1934. The biology of the vagina in the human subject. II. The bacterial flora and secretion of the vagina at various age - periods and their relation to glycogen in the vaginal epithelium. *J. Obstet. Gynecol. Br. Emp.* **41**: 208-294.
30. BROWN, W. 1978. Microbial ecology of the normal vagina. In: *The human vagina*. E.S.E. Hafez & T.N. Evans (Eds). Elsevier/North Holland, New York. pp. 407-420.
31. WEINSTEIN, L. & HOWARD, J.H. 1937. The incidence of the Döderlein vaginal bacillus during the post-climaterium. *Yale J. Biol. Med.* **10**: 185-189.
32. LARSEN, B. & GALASK, R.P. 1980. Vaginal microbial flora practical and theoretic relevance. *Obstet. Gynecol.* **55**(Suppl.5): 100-113.
33. GOPLERUD, C.P., OHM, M.J. & GALASK, R.P. 1976. Aerobic and anaerobic flora of the cervix during pregnancy and the puerperium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **126**(2): 858-868.
34. ROGOSA, M. & SHARPE, M.E. 1960. Species differentiation of human vaginal lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.* **23**: 197-201.
35. TRAMER, J. 1966. Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*. *Nature* **211**: 204-205.
36. VINCENT, J.G., VEOMETT, R.C. & RILEY, R.F. 1959. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* **78**: 477-484.
37. WEINSTEIN, L. & WICKERHAM, L.J. 1938. The yeast - like fungi of the human vagina. *Yale J. Biol. Med.* **10**: 553-558.
38. GREGOIRE, A.J., KANDIL, O. & LEDGER, W.J. 1971. The glycogen content of the human vaginal epithelial tissue. *Fertil. Steril.* **22**: 64-68.
39. OSBORNE, N.G., WRIGHT, R.C. & GRUBIN, L. 1979. Genital bacteriology: a comparative study of premenopausal women with postmenopausal women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **135**: 195-198.
40. LINDNER, J.G.E. & PLANTEMA, F.H.F. 1978. Quantitative studies of the vaginal flora of healthy women and of obstetric and gynecological patients. *J. Med. Microbiol.* **11**: 233-241.
41. TAYLOR, E., BLACKWELL, A.L., BARLOW, D. & PHILLIPS, I. 1982. *Gardnerella vaginalis*, anaerobic and vaginal discharge. *Lancet* **i**: 1376-1379.
42. GORBACH, S.L., MENDA, K.L.E., THADEPALLI, H. & KEITH, L. 1973. Anaerobic microflora of the cervix in healthy women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **117**: 1053-1055.
43. DUERDEN, B.I. 1980. The isolation and identification of *Bacteroides* spp. from the normal human vaginal flora. *J. Med. Microbiol.* **13**: 79-87.
44. OHM, M.J. & GALASK, R.P. 1975 Bacterial flora of the cervix from 100 prehisterectomy patients. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **122**(6): 683-687.
45. BARTLETT, J.G., ONDERDONK, A.L.E., DRUDE, E., GOLDSTEIN, C., ANDERKA, M., ALPERT, S. & McCORMACK, W.M. 1977. Quantitative bacteriology of the vaginal flora. *J. Infect. Dis.* **136**(2): 271-277.
46. HAMMERSCHLAG, M.R., ROSNER, I, THURSTON, P., SENINE, D., MC COMB, D., McCORMACK, W.M., ALPERT, S. & ROSNER, L. 1978. Microbiology of the vagina in children: normal and potentially pathogenic organisms. *Pediatrics* **62**: 57-62.
47. BROWN, W.J. 1982. Variations in the vaginal bacterial flora. A preliminary report. *Ann. Intern. Med.* **96**(2): 931-934.
48. GOLDACRE, M.J., WATT, B., LONDON, N., MILNE, L.J.R., LONDON, J.D.O. & VESSEY, M.P. 1979. Vaginal microbial flora in normal young women. *Br. Med. J.* **1**: 1450-1453.
49. SPARKS, R.A., PURRIER, B.G.A., WATT, P.J. & ELSTEIN, M. 1977. The bacteriology of the cervix and uterus. *Br. J. Obstet. Gynecol.* **84**: 701-704.
50. OHM, M.J. & GALASK, R.P. 1975. The effects of antibiotic prophylaxis on patients undergoing vaginal operations. II. Alterations of the microbial flora. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **123**: 597-604.
51. OHM, M.J. & GALASK, R.P. 1976. The effects of antibiotic prophylaxis on patients undergoing total abdominal hysterectomy. II. Alterations on microbial flora. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **125**: 448-454.
52. FARO, S. & PHILLIPS, L.E. 1987. Non-specific vaginitis or vaginitis of undetermined aethiology. *Int. J. Tissue React.* **9**: 173-177.
53. DIENES, L. & EDSALL, G. 1937. Observations of the L organism of Klieneberger. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **36**: 740-744.
54. McCORMACK, W.M., ALMEIDA, P.C., BAILEY, P.E., GRADY, E.M. & LEE, Y.H. 1972. Sexual activity and vaginal colonization with genital mycoplasmas. **221**: 1375-1377.
55. McCORMACK, W.M., BRAUN, P., LEE, Y.H., KLEIN, J.O. & KASS, E.N. 1972. The genital mycoplasmas. *N. Engl. J. Med.* **288**: 78-89.
56. TAYLOR ROBINSON, D. & McCORMACK, W.M. 1979. Mycoplasmas in human genital infections. In: *The mycoplasmas*. J.G. Tully & R.F. Whitcomb (Eds). Vol. 2. Human and animal mycoplasmas. Academic Press, New York. pp. 307-366.

57. McCORMACK, W.M., ALPERT, S., McCOMB, D.E., NICHOLS, R.L., SEMINE, D.Z. & ZINNER, S.H. 1979. Fifteen-month following study of the women infected with *Chlamidia trachomatis*. *N. Engl. J. Med.* **300**: 123-125.
58. GROSSMAN, J.H. 1982. *Herpes simplex virus* (HSV) infection. *Clin. Obstet. Gynecol.* **25**: 555-559.
59. MONDELLO, F., GUGLIELMINETTI, M., TOROSANTUCCI, A., CEDDIA, T., AGATENSI, L. & CASSONE, A. 1986. Yeast species isolated from outpatients with vaginal candidosis attending a gynecological centre in Rome. *IRCS Med. Sci.* **14**: 746-747.
60. DONNE', M.A. 1836. Animalcules observées dans les matières purulentes et le produit des sécrétions des organes génitaux de l'homme et de la femme. *C. R. Hebd. Sceances Acad. Sci.* **3**: 385-386.
61. HOEHNE, O. 1916. *Trichomonas vaginalis* als haufigen erregar liner typischen colpits purulenta. *Zentralbl. Gynaekol.* **40**: 4-8.
62. NAGUIB, S.M., COMSTOCK, G.W. & DAVIS, H.J. 1966. Epidemiologic study of trichomoniasis in normal women. *Obstet. Gynecol.* **27**: 607-616.
63. FOUTS, A.C. & KRAUS, S.J. 1980. *Trichomonas vaginalis*: reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. *J. Infect. Dis.* **141**: 137-143.
64. GARDNER, H.L. & DUKES, C.D. 1954. New etiologic agent in non specific bacterial vaginitis. *Science* **120**: 853.
65. GARDNER, H.L. & DUKES, C.D. 1955. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified "non specific" vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **69**(5): 962-976.
66. SPIEGEL, C.A., AMSEL, R. & HOLMES, K.K. 1983. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram Stain of vaginal fluid. *J. Clin. Microbiol.* **8**: 170-177.
67. BLACKWELL, A.L. & BARLOW, D. 1982. Clinical diagnosis of anaerobic vaginosis (non-specific vaginitis). A practical guide. *Br. J. Vener. Dis.* **58**: 387-393.
68. BLACKWELL, A.L., FOX, A.R., PHILIPS, J. & BARLOW, D. 1983. Anaerobic vaginosis (non-specific vaginitis): clinical, microbiological and therapeutical findings. *Lancet* **ii 8364**: 1379-1382.
69. SPIEGEL, C.A., AMSEL, R., ESCHENBACH, D., SCHOENKNECAT, F. & HOLMES, K.K. 1980. Aerobic bacteria in non specific vaginitis. *N. Engl. J. Med.* **303**: 601-607.
70. GARDNER, H.L. & DUKES, C.D. 1959. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **3**: 280-289.
71. GARDNER, H.L. & KAUFMAN, R.H. 1969. *Benign diseases of the vulva and vagina*. The C.V. Mosby Company, Ed. 1 St. Louis, Missouri. chap. 13.
72. GARDNER, H.L. & KAUFMAN, R.H. 1981. *Benign disease of the vulva and vagina*. G.K. Hell e Company, Ed. 2 Boston 1981. chap. 14.
73. GARDNER, H.L. 1983. Pathogenicity of *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*). *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **40**: 37-40.
74. McCORMACK, W.M., HAYES, C.A., ROSNER, B., EVRARD, J.R., CROCKETT, V.A., ALPERT, S. & ZINNER, S. 1977. Vaginal colonization with *Corynebacterium vaginale* (*Haemophilus vaginalis*). *J. Infect. Dis.* **136**: 740-745.
75. PHEIFER, T.A., FORSYTH, P.S., DURFEE, M.A., POLLOCK, H.M. & HOLMES, K.K. 1978. Non specific vaginitis. Role of *Haemophilus vaginalis* and treatment with metronidazole. *N. Engl. J. Med.* **298**: 1429-1434.
76. CHEN, R.C.S., FORSYTH, P.S., BUCHANAN, T.M. & HOLMES, K.K. 1979. Amine content of vaginal fluid from untreated and treated patients with non specific vaginitis. *J. Clin. Invest.* **63**: 828-835.
77. SPIEGEL, C.A., AMSEL, R., ESCHENBACH, D. & SCHOENKNECHT HOLMES, K.K. 1980. Anaerobic bacteria in non specific vaginitis. *N. Engl. J. Med.* **303**: 601-607.
78. SPIEGEL, C.A., DAVICK, P. & TOTTEN, P.A. 1983. *Gardnerella vaginalis* and anaerobic bacteria in the etiology of bacterial (non specific) vaginosis. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **40**: 41-46.
79. BROWN, D.JR., KAUFMAN, R.H. & GARDNER, H.L. 1984. *Gardnerella vaginalis* vaginitis: the current opinion. *J. Reprod. Med.* **29**: 300-306.
80. GIACOMINI, G., REALI, D., VITA, D., BARAHMANDPOUR, S. & D'ACUNTO, A. 1987. The diagnostic cytology of non-specific vaginitis. *Diagn. Cytopathol.* **3**: 198-205.
81. HJELM, E., HALLEN, A., FORSUM, U. & WALLING, J. 1981. Anaerobic curved rods in vaginitis. *Lancet* **ii**: 1353-1354.
82. CHEN, K.C.S., AMSEL, R., ESCHENBACH, D.A. & HOLMES, K.K. 1982. Biochemical diagnosis of vaginitis. Determination of diamines in vaginal fluid. *J. Infect. Dis.* **145**: 337-345.
83. BALSODON, M.J., TAYLOR, G.E., PEAD, L. & MASKELL, R. 1980. *Corynebacterium vaginale* and vaginitis: a controlled trial of treatment. *Lancet* **i**: 501-504.
84. DELLENBACK, P., SPINGARN, I., OHL, J., GOETZ, M.L., EBERHART, R. & KOEL, C. 1985. Léucorrhée malodorante pour vaginite à *Gardnerella vaginalis*. 'Etude biochimique des sécrétions vaginales. *Presse Med.* **14**: 1711-1712.

85. HILL, G.L.E., GALL, S.A., KOHAN, A.P. & AYERS, O.M. 1978. *Bacteroides bivius*, *Bacteroides distiens* and other Gram-negative anaerobic bacilli in the vaginal flora of premenopausal women. In: 78. annual meeting of the American Society for Microbiology. Las Vegas, May 14-15.
86. BLACKWELL, A., FOX, A., PHILLIPS, I. & BARLOW, D. 1983. Metronidazole in treatment of non-specific vaginitis. Clinical and microbiological findings in ten patients given 2 grams of metronidazole. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **40**: 103-106.
87. BALSDON, M.J. 1983. Treatment of the *Gardnerella vaginitis* syndrome with a single 2 g oral dosage of metronidazole. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **40**: 101-102.
88. MOHANLY, K.C. & DEIGTON, R. 1987. Comparison of 2 g single dose of metronidazole, nimorazole and tinidazole in the treatment of vaginitis associated with *Gardnerella vaginalis*. *J. Antimicrobiol. Chemother.* **19**: 393-399.
89. JONES, B.M., GEARY, I., ALAWATTEGAMA, A.L.E., KINGORI, G.R. & DUERDEN, B.I. 1985. *In vitro* and *in vivo* activity of metronidazole against *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp. and *Mobiluncus* spp. in bacterial vaginosis. *J. Antimicrobiol. Chemother.* **16**: 189-197.
90. WILLIS, A.T., BULLEN, C. & FERGUSON, R. 1974. Metronidazole in the prevention and treatment of bacteroides infections in gynecological patients. *Lancet* **ii**: 1540-1543.
91. BANNATYNE, R., JACKSWKI, J., CHEUNG, R. & BIEERS, K. 1987. Susceptibility of *Gardnerella vaginalis* to metronidazole, its bioactive metabolites and tinidazole. *Am. J. Clin. Pathol.* **87**: 640-641.
92. SKARIN, A. & SYLWAN, J. 1986. Vaginal lactobacilli inhibiting growth of *G. vaginalis*, *Mobiluncus* and other bacterial species cultured from vaginal content of women with bacterial vaginosis. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B.* **94**: 399-403.
93. MAGLIANO, E.M., CONTI, M., CLERICI, P. & LAURITA, L. 1987. The role of benzydamine in the topical treatment of the so-called non-specific vaginitis. *Int. J. Tissue React.* **9**: 151-156.
94. LEOPOLD, S. 1953. Heretofore undescribed organism isolated from the genito-urinary system. *U.S. Armed Forces Med. J.* **4**: 263-266.
95. GARDNER, H.L. 1980. *Haemophilus vaginalis* after twenty-five years. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **137**: 385-391.
96. AOKI, Y., KAWAI, K. & NAKAMURA, T. 1952. An organisme resembling *Haemophilus ducroyi*; a species found at a high rate in genital of prostitutes in the Gasebo area. *Yokohama Med. Bull.* **3**: 310-314.
97. BLINICK, G., STEINBERG, P. & MERENDINO, J.V. 1949. Effect of sulfonamide cream on the bacterial flora of the infected vagina and cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **58**: 176-180.
98. AMIES, C.R. & JONES, S.F. 1957. A description of *Haemophilus vaginalis* and its L form. *Can. J. Microbiol.* **3**: 579-583.
99. THOMPSON, L. 1936. Other oxydase positive bacteria found in cultures made for *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **31**: 80-84.
100. HENRIKSEN, S.D. 1947. Gram-negative diplo-bacilli from the genitourinary tract. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **24**: 184-187.
101. LAPAGE, S.P. 1961. *Haemophilus vaginalis* and its role in vaginitis. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **52**: 35-54.
102. ZINNEBANN, K. & TURNER, G.C. 1963. The taxonomic position of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*). *J. Pathol. Bacteriol.* **85**: 213-219.
103. GREENWOOD, J.R. & PICKETT, M.J. 1980. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes). *Comb. nov. Intern. J. System. Bacteriol.* **30**: 170-178.
104. DUNKELBERG, W.E. Jr. & McVEIGH, I. 1969. Growth requirements of *Haemophilus vaginalis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **35**: 129-149.
105. EDMUNDS, P.N. 1962. The biochemical, serological and haemagglutinating reactions of *Haemophilus vaginalis*. *J. Pathol. Bacteriol.* **83**: 411-422.
106. GREENWOOD, J.R. & PICKETT, M.J. 1979. Salient features of *Haemophilus vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.* **9**: 200-204.
107. EDMUNDS, P.N. 1960. *Haemophilus vaginalis*: morphology, cultural characters and viability. *J. Pathol. Bacteriol.* **79**: 273-284.
108. PARK, C.H., FAUBER, M. & COOK, C.L.E. 1968. Identification of *Haemophilus vaginalis*. *Am. J. Clin. Pathol.* **38**: 590-593.
109. SMITH, R.F. 1975. New medium for isolation of *Corynebacterium vaginale* from genital specimens. *Health Lab. Sci.* **12**: 219-224.
110. GOLDBERG, R.L. & WASHINGTON, J.A. 1976. Comparison of isolation of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*) from peptone-starch-destrose-agar and Columbia colistin-nalidixic acid agar. *J. Clin. Microbiol.* **4**: 245-247.
111. GREENWOOD, J.R., PICKETT, M.J., MARTIN, W.J. & MACK, E.G. 1977. *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*): method for isolation and rapid biochemical identification. *Health Lab. Sci.* **14**: 102-106.
112. MICHELSEN, P.A., McCARTHY, L.R. & MANGUM, M.E. 1977. New differential medium for the isolation of *Corynebacterium vaginale*. *J. Clin. Microbiol.* **5**: 488-489.

113. TOTTEN, P.A., AMSEL, R., HALE, J., PIOT, P. & HOLMES, K.K. 1982. Selective differential human blood bilayer media for isolation of *Gardnerella (Haemophilus) vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.* **15**: 141-147.
114. LEVISON, M.E., TRESTMAN, I., QUACH, R., SLADOWSKI, C. & FLORO, C.N. 1979. Quantitative bacteriology of the vaginal flora in vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **133**: 139-144.
115. SMITH, R.F., ROGERS, H.A., SINES, P.A. & RAY, R.M. 1977. Comparison between microscopic and cultural methods for recognition of *Corynebacterium vaginale* in women with vaginitis. *J. Clin. Microbiol.* **5**: 268-273.
116. ISON, C.A., DAWSON, S.G., HILTON, J., CSONKA, G.W. & EASMON, C.S.F. 1982. Comparison of culture and microscopy in the diagnosis of *Gardnerella vaginalis* infection. *J. Clin. Pathol.* **35**: 550-554.
117. PIOT, P. & VAN DYCK, E. 1983. Isolation and identification of *Gardnerella vaginalis*. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **40**: 15-18.
118. HANSEN, W., VRAY, B., MILLER, K., CROKAERT, F. & YOURASSOWSKI, E. 1987. Detection of *Gardnerella vaginalis* in vaginal specimens by direct immunofluorescence. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1934-1937.
119. SMARON, W.F. & VICE, J.L. 1974. Analysis of *Corynebacterium vaginale* by an immunodiffusion technique. *Appl. Microbiol.* **27**: 469-474.
120. BOUSTOULLER, Y.L., JOHNSON, A.P. & TAYLOR ROBINSON, D. 1986. Detection of a species-specific antigen of *Gardnerella vaginalis* by Western Blot analysis. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1969-1973.
121. EASMON, C.S.F., CLARK, L., CRANE, J.P. & GREEN, R. 1985. Phagocytosis and killing of *Gardnerella vaginalis* by human neutrophils. *J. Clin. Pathol.* **38**: 747-749.
122. BREWER, J.I., HALPERN, B. & THOMAS, G. 1957. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **74**: 834-842.
123. GRAY, L.A. & BARNES, M.L. 1965. Vaginitis in women, diagnosis and treatment. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **92**: 125-136.
124. CRISWELL, B.S., LADWIG, C.L., GARDNER, H.L. & DUKES, C.D. 1969. *Haemophilus vaginalis*: vaginitis by inoculation from culture. *Obstet. Gynecol.* **33**: 195-199.
125. LEVISON, M.E., CORMAN, L.C., CARRINGTON, E.R. & KAYE, D. 1977. Quantitative microflora of the vagina. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **127**: 80-85.
126. HELTAI, A. & TALEGHANY, P. 1959. Non specific vaginal infections: a critical evaluation of *Haemophilus vaginalis*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **77**: 411-418.
127. FRAMPTON, J. & LEE, Y. 1964. Is *Haemophilus vaginalis* a pathogen in the female genital tract? *J. Obstet. Gynecol. Br. Commonw.* **71**: 436-442.
128. GORDON, A.M., HUGHES, H.E. & BARR, G.T.D. 1966. Bacterial flora in abnormalities of the female genital tract. *J. Clin. Pathol.* **19**: 429-432.
129. REIN, M.F. 1981. Current therapy of vulvovaginitis. *Sex. Transm. Dis.* **8**: 316-320.
130. TARLINGTON, M.N. & D'ABRERA, V.S.E. 1967. Identity of disputed *Haemophilus*-like organism in non-specific vaginitis. *J. Pathol. Bacteriol.* **93**: 109-118.
131. CARNEY, F.E. 1973. *Haemophilus vaginalis* septicemia. *Obstet. Gynecol.* **41**: 78-79.
132. MONIF, G.R.G. & BAER, H. 1974. *Haemophilus (Corynebacterium) vaginalis* septicemia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **120**: 1041-1045.
133. VENKATARAMANI, T.K. & RATHBUN, H.K. 1970. *Corynebacterium vaginale* bacteremia: clinical study of 29 cases. *Med. J.* **139**: 93-97.
134. PLATT, M.S. 1971. Neonatal *Haemophilus vaginalis (Corynebacterium vaginale)* infection. *Clin. Pediatr.* **10**: 513-515.
135. ROTHAM, E.B. & SCHICK, S.F. 1969. Nonclostridial anaerobic bacteria in septic abortion. *Am. J. Med.* **46**: 80-83.
136. McFADYN, I.D., GLASY, M.B. & EYKYN, S.J. 1968. Suprapubic aspiration of urine in pregnancy. *Lancet* **1**: 1112-1114.
137. DUNKELBERG, W.E. & BOSMAN, R.I. 1961. *Haemophilus vaginalis*; incidence among 431 specimens examined. *Mil. Med.* **26**: 920-925.
138. DUNKELBERG, W.E., HEFNER, J.D. & PATOW, W.E. 1962. *Haemophilus vaginalis* among asymptomatic women. *Obstet. Gynecol.* **20**: 629-623.
139. MENDEL, E.B. & HABERMAN, S. 1965. The vaginal ecology and its relationship to symptoms in vaginitis. *South Med. J.* **58**: 374-378.
140. LEWIS, F.J., O'BRIEN, S.M., URAL, U.M. & BURKE, E.G. 1971. *Corynebacterium vaginale* vaginitis in pregnant women. *Am. J. Clin. Pathol.* **56**: 580-583.
141. AKERLUND, M. & MARDH, P.A. 1974. Isolation and identification of *Corynebacterium vaginale (Haemophilus vaginalis)* in women with infections of the lower genital tract. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **53**: 85-89.

142. JOSEY, W.E. & LAMBE, D.W. 1976. Epidemiological characteristics of women infected with *Corynebacterium vaginale* (*Haemophilus vaginale*). *J. Am. Vener. Dis. Assoc.* **3**: 9-13.
143. AMSEL, R., TOTTEN, P.A., SPIEGEL, C.A., CHEN, K.C.S., ESCHENBACH, D.A. & HOLMES, K.K. 1983. Non specific vaginitis diagnostic criteria and microbial and epidemiological association. *Am. J. Med.* **74**: 14-22.
144. ADMAD, F.J. & SAYED, S.M. 1985. Vaginal infection with *Gardnerella vaginalis*. *Practitioner* **229**: 273-277.
145. CEDDIA, T., CIALFI, R., BRANCA, M., DE PAULIS, A., CAPPÀ, F. & FACCHINI, D. 1986. Prima indagine sulla presenza di *Gardnerella vaginalis* in donne con e senza vaginite. In: *Le infezioni in ostetricia e ginecologia*. Mondadori Editore, Bologna. pp. 403-406.
146. ESCHENBACH, D.A. 1982. A guide to diagnosis and treatment of vaginal infection. *Contemp. Obstet. Gynecol.* **20**: 203-207.
147. SCOTT, T.G., SMYTH, C.H. 1987. Haemagglutination and tissue culture adhesion of *Gardnerella vaginalis*. *J. Gen. Microbiol.* **1133**: 1999-2005.
148. BOUSTOULLER, Y.L., JOHNSON, A.P., ROBINSON-TAYLOR, D. 1987. Pili on *Gardnerella vaginalis* studied by electron microscopy. *J. Med. Microbiol.* **23**: 327-329.
149. JOHNSON, A.P., BOUSTOULLER, J.L. 1987. Extra-vaginal infection caused by *Gardnerella vaginalis*. *Epidemiol. Infect.* **98**: 131-137.
150. STAERFERT, F., GUNDERSEN, J.J., HALSOS, A.M., BARLINN, C., JOHANSEN, A.G. NIRREGAARD, K.M. & ENG J. 1983. A survey of genital infections in patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **40**: 53-57.
151. CHATTOPADHYAY, B. & TELI, J.C. 1984. Isolation of *Gardnerella vaginalis* from routine genito-urinary tract specimens. *J. Infect.* **8**: 157-162.
152. GARDNER, H.L., DAMPEER, T.K. & DUKES, C.D. 1957. The prevalence of vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **73**: 1080-1087.
153. DUNKELBERG, W.E., SKAGGS, R. & KELLOGS, D.S. 1970. Relative incidence of *Corynebacterium vaginale* (*Haemophilus vaginalis*), *Neisseria gonorrhoea* and *Trichomonas* ssp. among women attending a venereal disease clinic. *Br. J. Vener. Dis.* **64**: 187-190.
154. KUMMEL, J. & RITZERFELD, W. 1961. Untersuchungen über die klinische Bedeutung von *Haemophilus vaginalis*. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* **21**: 249-252.
155. KARPOVSKAYA, O.G. 1971. The role of *Haemophilus vaginalis* infection of female genitalis (title translated). *Akush. Ginekol. (Moskow)* **47**: 33-36.
156. KINGHORN, G.R., JONES, B.M., CHONDHURY, F.H. & GEARY, I. 1982. Balanoposthitis associated with *Gardnerella vaginalis* infections in men. *Br. J. Vener. Dis.* **58**: 128-130.
157. RALPH, E.D. 1983. Comparative antimicrobial activity of metronidazole and the hydroxy metabolite against *Gardnerella vaginalis*. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **40**: 115-120.