



Università del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica - DISIT

Sede di Alessandria

Corso di Laurea magistrale in Biologia

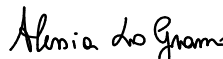
TESI DI LAUREA MAGISTRALE

"Analisi microbiologica dei tamponi vaginali: distribuzione dei microrganismi isolati e profili di sensibilità agli antibiotici in una popolazione femminile"

Relatrice: Dr.ssa Giorgia Novello 

Correlatore: Dr. Gianmaria Cabrini

Candidata: Lo Grasso Alessia


Matricola: 20031507

ANNO ACCADEMICO

2025/26

“Vinca dunque la perseveranza, perché, se la fatica è tanta, il premio non sarà mediocre. Tutte le cose preziose son poste nel difficile”.

-Giordano Bruno

INDICE

INTRODUZIONE	1
1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL TRATTO CERVICO-VAGINALE	2
1.2 MICROBIOTA VAGINALE	5
1.2.1 Composizione del microbiota vaginale	6
1.2.2 Fattori che influenzano l'equilibrio del microbiota vaginale	7
1.2.3 Ruolo protettivo del microbiota vaginale	9
1.3. DISBIOSI DEL MICROBIOTA CERVICO-VAGINALE	10
1.4. INFEZIONI CERVICO-VAGINALI CORRELATE ALLA DISBIOSI	12
1.4.1 La vaginosi batterica	12
1.4.2 Complicanze e conseguenze della vaginosi batterica	14
1.4.3 Terapia antibiotica	15
1.5. TAMPONI CERVICO-VAGINALI NELLA DIAGNOSI DELLA DISBIOSI	16
1.5.1 Tampone a secco e con terreno di coltura: differenze diagnostiche	16
2.SCOPO DEL LAVORO	19
3. MATERIALI E METODI	21
3.1 RACCOLTA DEL TAMPONE: CHECK-IN E GESTIONE DEL CAMPIONE	22
3.2 SEMINA SU PIASTRA	23
3.2.1 Columbia Agar +5% sheep blood (COS)	23
3.2.2 MacConkey Agar (MCK)	24
3.2.3 Columbia Agar + colistina e acido nalidixico + 5% sheep blood (CNA)	25
3.2.4 Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 Agar (SGC2)	26
3.2.5 Procedura di semina e incubazione	27
3.3 ANALISI MICROSCOPICA	28
3.3.1 Colorazione di Gram	29
3.3.2 Esame microscopico	29
3.4 IDENTIFICAZIONE BATTERICA MEDIANTE SISTEMA VITEK 2	31
3.5 CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC)	32
3.5.1 Epsilometer test (E-test)	33
4. RISULTATI	36
4.1 ESITI COLTURALI DEI TAMPONI CERVICO-VAGINALI	37
4.2 DISTRIBUZIONE DEI CAMPIONI POSITIVI PER FASCIA DI ETA'	38
4.3 DISTRIBUZIONE DEI MICRORGANISMI NEI CAMPIONI POSITIVI	40

4.4 DISTRIBUZIONE DEGLI ISOLATI BATTERICI	41
4.5 CARATTERIZZAZIONE MICROBIOLOGICA E PROFILO DI SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI DEI PRINCIPALI ISOLATI BATTERICI	42
4.5.1 <i>Escherichia coli</i>	43
4.5.2 <i>Streptococcus agalactiae</i>	47
4.5.3 <i>Enterococcus faecalis</i>	50
4.5.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	53
4.5.5 <i>Proteus mirabilis</i>	56
4.5.6 Analisi complessiva	59
5. DISCUSSIONE	62
6. CONCLUSIONI	67
BIBLIOGRAFIA	69

1. INTRODUZIONE

1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL TRATTO CERVICO-VAGINALE

Il tratto cervico-genitale costituisce la porzione inferiore dell'apparato genitale interno femminile ed è composto da due strutture anatomicamente e morfologicamente distinte: la **cervice uterina** e la **vagina**. Sebbene queste componenti cooperino dal punto di vista funzionale, esse presentano aspetti morfologici differenziati (Figura 1).

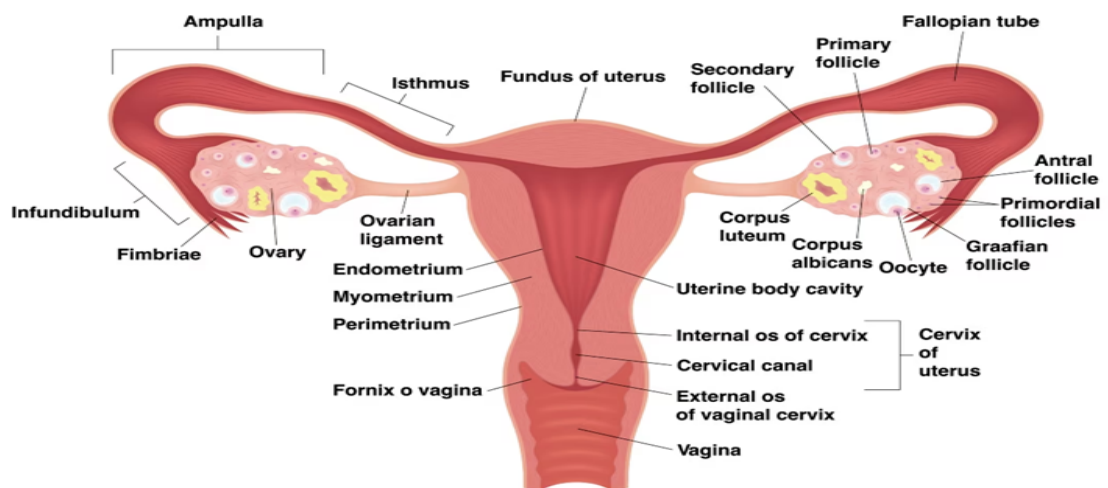


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'apparato genitale femminile. In evidenza, nella porzione inferiore, il tratto cervico-genitale composto dal canale cervicale e dalla vagina ()

La **cervice uterina**, nota anche come “collo dell'utero”, rappresenta la porzione inferiore dell'utero e presenta una morfologia cilindro-conica, di consistenza parenchimatosa, con una lunghezza circa 2.5-3 cm e una larghezza di circa 2.5 cm (Oh et al., 2021). Le dimensioni e le proporzioni della cervice variano significativamente in base all'età e allo stato riproduttivo della donna. Nella fase prepuberale, la cervice rappresenta una porzione più ampia dell'utero rispetto all'età adulta, arrivando a costituire circa la metà della dimensione totale dell'utero (Kelsey et al., 2016). Nella donna in età fertile e soprattutto in post-gravidanza, le dimensioni relative diminuiscono, arrivando a rappresentare circa 1/3 dell'intero organo (Oh et al., 2021).

Da un punto di vista fisiologico, l'epitelio endocervicale costituisce la principale barriera fisica e biochimica tra l'ambiente esterno vaginale e la cavità uterina (Anahtar et al., 2018; Lacroix et al., 2020). Le cellule del canale endocervicale secernono muco idrato composto prevalentemente da mucine ed elettroliti, la cui organizzazione dà origine al tappo mucoso (Lacroix et al., 2020). Questa struttura blocca il canale cervicale per ostacolare il passaggio di patogeni esterni o corpi estranei. Al suo interno si trovano intrappolati immunoglobuline, enzimi ad azione antimicrobica, cellule immunitarie e cellule epiteliali di sfaldamento, che cooperano nel rafforzare la barriera e nel conferire efficaci proprietà battericide (Yarbrough et al., 2015; Lacroix et al., 2020).

La consistenza e la permeabilità del muco cervicale sono finemente modulate dal quadro ormonale. In particolare, durante la fase ovulatoria, il muco diventa più sottile ed è costituito da un fine network acellulato di filamenti che facilita il passaggio degli spermatozoi verso corpo uterino e, eventualmente, nelle tube di Falloppio, dove può avvenire la fecondazione. Al contrario, durante la gravidanza, si assiste alla formazione di una struttura densa e viscoelastica che isola l'ambiente uterino e protegge il feto (Lacroix et al., 2020).

La cervice e l'utero sono strutture flessibili, che contengono fibre elastiche in aggiunta a muscolo. Questo è ancora più evidente durante il parto quando la cervice si deve dilatare fino ad un diametro di dieci centimetri circa per consentire il passaggio del feto nel canale vaginale. Se la fecondazione non avviene, il miometrio cervicale si dilata per far passare il materiale mestruale (rivestimento endometriale sfaldato). È riconosciuto che questa dilatazione causa la sensazione di dolore e disagio comunemente chiamata "dolore mestruale". Queste caratteristiche fisiologiche della cervice sono tutte controllate dagli ormoni estrogeni e progesterone. La cervice uterina è rivestita da due diversi tipi di epitelio, l'epitelio squamoso pluristratificato non cheratinizzante, l'ESOCERVICE, e

l'epitelio cilindrico semplice, ENDOCERVICE. Il punto di passaggio tra l'epitelio pavimentoso composto e l'epitelio cilindrico semplice, viene denominato "GIUNZIONE SQUAMO-COLONNARE" o "ZONA DI TRASFORMAZIONE". Nell'esocervice è possibile osservare una cheratinizzazione superficiale dovuta alla eccessiva sintesi di citocheratine, con progressiva picnosi e carioressi, con conseguente formazione superficiale di "squame cornee" anucleate. Lo spessore dell'epitelio è in funzione dello stato ormonale della donna. Nelle adolescenti e nelle donne in post-menopausa, la carenza estrogenica determina un'atrofia epiteliale, caratterizzata da una riduzione significativa degli strati epiteliali. Durante il periodo fertile, in seguito alla stimolazione progestinica, si determina un aumento di spessore delle cellule dello strato intermedio il cui citoplasma contiene glicogeno. Inoltre, si ha un continuo rinnovamento epiteliale a seguito di una rapida successione delle fasi di proliferazione-maturazione-desquamazione. L'epitelio squamoso che riveste l'esocervice può essere suddiviso in quattro zone ben distinte:

- Strato basale (o germinativo), che costituisce la matrice epiteliale;
- Strato parabasale;
- Strato intermedio (o spinoso);
- Strato superficiale, ove avviene la completa maturazione cellulare.

Invece, l'epitelio cilindrico semplice, che riveste l'endocervice, è costituito da cellule colonnari, dal tipico aspetto a palizzata, che presentano solamente rari filamenti di citocheratine.

Per quanto riguarda **la vagina**, invece, è un condotto fibromuscolare rivestito da epitelio pavimentoso stratificato non cheratinizzato, che si estende dal vestibolo vaginale all'utero. La sua estremità superiore circonda la porzione esocervicale della cervice uterina; il recesso che si forma tra la porzione vaginale della cervice e la vagina prende il nome di **fornice**, distinguibile in fornice anteriore, posteriore e laterali.

La parete vaginale è costituita da una tonaca mucosa e da uno strato muscolare interno, strettamente aderenti tra loro. Sulla superficie epiteliale sono presenti due creste mediane longitudinali, una anteriore e una posteriore. L'epitelio di rivestimento, di tipo pavimentoso stratificato non cheratinizzato, dopo la pubertà si ispessisce e le cellule superficiali accumulano glicogeno, conferendo loro un aspetto chiaro nelle preparazioni istologiche.

L'epitelio vaginale non subisce marcate modificazioni morfologiche durante il ciclo mestruale; tuttavia, il contenuto di glicogeno varia in relazione alle fluttuazioni ormonali, aumentando dopo l'ovulazione e diminuendo verso la fine del ciclo. Il glicogeno rilasciato dalle cellule desquamate viene metabolizzato dalla flora batterica vaginale, in particolare dai lattobacilli (*Lactobacillus spp.*), con produzione di acido lattico. Ne deriva un ambiente acido, con pH generalmente compreso tra 3,8 e 4,5, che inibisce la proliferazione di numerosi microrganismi patogeni. Di conseguenza, le infezioni vaginali risultano più frequenti nelle fasi della vita in cui la concentrazione di glicogeno è ridotta, come nel periodo prepuberale e in menopausa.

1.2 MICROBIOTA VAGINALE

L'insieme delle caratteristiche anatomiche, istologiche, biochimiche ed ormonali descritti nel capitolo precedente contribuisce alla definizione di un microambiente vaginale dinamico e selettivo, nel quale il microbiota rappresenta una componente fondamentale dell'omeostasi cervico-vaginale.

Il microbiota vaginale è definito come la complessa comunità di microrganismi che colonizza la cavità vaginale in condizioni fisiologiche di eubiosi (Borrego-Ruiz and Borrego, 2025; Zhang et al., 2026). Si tratta di un ecosistema dinamico, generalmente caratterizzato da una bassa diversità microbica e dalla predominanza di batteri del genere

Lactobacillus (Revel et al., 2011; Borrego-Ruiz and Borrego, 2025). Questo equilibrio contribuisce al mantenimento dell'omeostasi dell'ambiente vaginale e alla protezione nei confronti della colonizzazione da parte di microrganismi potenzialmente patogeni.

1.2.1 Composizione del microbiota vaginale

Il microbiota vaginale è caratterizzato, in condizioni fisiologiche, dalla predominanza di batteri appartenenti al genere *Lactobacillus*. Tra le specie più frequentemente riscontrate nelle donne in età fertile figurano *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus jensenii* (Ravel et al., 2011; Gajer et al., 2012; Cheng et al., 2025). Questi microrganismi rappresentano una componente rilevante dell'ecosistema vaginale e contribuiscono in larga parte a determinare le caratteristiche biologiche e chimico-fisiche.

L'avvento delle tecniche di sequenziamento e dell'analisi metagenomica ha permesso di identificare differenti profili di composizione microbica, definiti “**Community State Types**” (CST). Il microbiota vaginale viene classificato in cinque CST, distinti principalmente in base alla specie di *Lactobacillus* dominante. Nello specifico, il CST I è dominato da *L. crispatus*, il CST II da *L. gasseri*, il CST III da *L. iners* e il CST V da *L. jensenii*. Al contrario, CST IV è caratterizzato da una ridotta presenza di lattobacilli e da un'elevata diversità batterica composta da microrganismi anaerobi (Gajer et al., 2012; Wang et al., 2022; Cheng et al., 2025; Jonouchi et al., 2026). In tali comunità possono essere presenti anche altri microrganismi, tra cui *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella* spp. e *Mobiluncus* spp., la cui abbondanza può aumentare in presenza di alterazione dell'equilibrio dell'ecosistema vaginale (Brotman, 2011; Jonouchi et al., 2026; Nieto et al., 2026). La composizione del microbiota vaginale risulta pertanto

variabile tra gli individui e soggetta all'influenza di molteplici fattori biologici e ambientali.

1.2.2 Fattori che influenzano l'equilibrio del microbiota vaginale

L'equilibrio ecologico del microbiota vaginale è influenzato da numerosi fattori biologici, ormonali, ambientali e comportamentali, i quali possono contribuire al mantenimento di condizioni fisiologiche oppure favorire alterazioni della flora microbica.

Tra i **fattori ormonali**, un ruolo rilevante è svolto dal ciclo mestruale. È noto che le comunità microbiche vaginali (CST) subiscono fluttuazioni dinamiche durante le mestruazioni, prima di tornare ai loro stati originali nelle fasi successive del ciclo. Durante il periodo mestruale si osserva un aumento della diversità alfa, associato a una diminuzione dell'abbondanza di *Lactobacillus* spp. In particolare, lo studio condotto da Srinivasan et al. (2010) ha evidenziato che l'abbondanza relativa di *Gardnerella vaginalis* e *Lactobacillus iners* aumenta temporaneamente durante le mestruazioni, in concomitanza con una netta riduzione di *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus jensenii*. Dopo le mestruazioni, si verifica generalmente una riduzione della presenza di *G. vaginalis* e un progressivo ripristino della dominanza dei lattobacilli, con ritorno alle condizioni precedenti (Srinivasan et al., 2010; Nieto et al., 2026; Zhang et al., 2026).

Anche l'**età** rappresenta un fattore determinante nella modulazione di questo ecosistema. Numerosi studi hanno riportato che le donne in età riproduttiva presentano generalmente un microbiota dominato da una o più specie di *Lactobacillus*; al contrario, con l'avvicinarsi della menopausa, la riduzione dei livelli di estrogeni circolanti determina uno spostamento verso un microbiota impoverito di lattobacilli, con conseguente aumento della suscettibilità alle infezioni vaginali (Ravel et al., 2011).

Tra i **fattori comportamentali e ambientali**, le pratiche di igiene femminile rivestono un ruolo significativo. La vagina è un organo autopulente e le secrezioni vaginali, costituite da cellule epiteliali desquamate, batteri e secrezioni ghiandolari, contribuiscono a proteggere dalle infezioni vulvovaginali. Le perdite vaginali fisiologiche sono normalmente di colore bianco o trasparente e presentano un odore lieve e non sgradevole. La loro qualità varia durante il ciclo mestruale: risultano dense e viscosi all'inizio del ciclo, mentre diventano più fluide e acquose durante l'ovulazione in relazione al picco di estrogeni. Per alcune donne, tali secrezioni possono essere percepite erroneamente come sgradevoli, inducendo all'utilizzo di prodotti per l'igiene intima con l'obiettivo di rimuovere fluidi e odori dalla zona genitale. In alcune popolazioni, fino al 95% delle donne ha utilizzato almeno un prodotto o una pratica per l'igiene, nonostante gli effetti sulla salute a breve e lungo termine siano ancora parzialmente sconosciuti. Il tipo e la frequenza di utilizzo di tali pratiche variano e possono essere correlati a preferenze personali o a influenze sociali, culturali e religiose. Oltre alle lavande vaginali, l'impiego di detergenti aggressivi, salviette e spray intimi, spesso promossi da strategie di marketing, può alterare la barriera mucosa, rimuovendo i lattobacilli protettivi e favorendo la disbiosi.

Un ulteriore fattore emergente è rappresentato dalla **dieta**, che influisce sul benessere generale dell'individuo e sulla suscettibilità a diverse condizioni patologiche, quali obesità e malattie infiammatorie. Nel contesto del microbioma vaginale, la ricerca ha dimostrato che un apporto insufficiente di micronutrienti, tra cui vitamine A, C, D, E, il β -carotene, i folati e il calcio, può aumentare il rischio di sviluppare vaginosi batterica (Holdcroft et al., 2023; Ram et al., 2025). Sono inoltre presenti evidenze che suggeriscono come un aumento dell'assunzione di carboidrati possa favorire la crescita di *Lactobacillus spp.* all'interno della vagina, attraverso l'incremento dei livelli di glicogeno libero. Il glicogeno viene infatti metabolizzato dai lattobacilli in acido lattico, contribuendo al mantenimento di un pH vaginale acido (Holdcroft et al., 2023; Borrego-Ruiz and Borrego, 2025).

Anche lo **stress cronico** rappresenta un fattore in grado di influenzare il microbiota vaginale. Esso stimola l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), promuovendo il rilascio di cortisolo dalla corteccia surrenale. Si ipotizza che la disbiosi vaginale correlata allo stress sia dovuta a livelli elevati di cortisolo, i quali possono sopprimere l'attività immunitaria e favorire la perdita della dominanza di *Lactobacillus spp.*

Infine, il **fumo di sigaretta** è stato associato a una maggiore prevalenza di vaginosi batterica e a un aumentato rischio di parto pretermine. Lo studio condotto da Payne et al. (2016) ha analizzato il microbioma vaginale di donne in gravidanza, evidenziando come il fumo aumenti significativamente le probabilità di rilevamento e colonizzazione stabili di patogeni opportunisti quali *Ureaplasma spp.* (in particolare, *U. parvum*), *Mycoplasma spp.* e *Candida spp.*, microrganismi notoriamente implicati nell'insorgenza del parto pretermine spontaneo.

Le alterazioni del microbiota vaginale indotte dai fattori sopra descritti possono essere identificate mediante il tampone cervico-vaginale, che rappresenta uno strumento diagnostico fondamentale per la valutazione della composizione microbica e per l'individuazione di eventuali condizioni patologiche.

1.2.3 Ruolo protettivo del microbiota vaginale

Il microbiota cervico-vaginale sano è dominato da diverse specie del genere *Lactobacillus*, le quali contribuiscono al mantenimento della condizione di eubiosi, definita come stato di equilibrio fisiologico del microbiota vaginale (Borrego-Ruiz and Borrego, 2025). In tale contesto, i lattobacilli svolgono un ruolo fondamentale nel garantire la stabilità dell'ecosistema vaginale attraverso molteplici meccanismi protettivi. In particolare, essi contribuiscono al mantenimento di un pH acido, condizione essenziale per inibire la crescita di microrganismi patogeni. Inoltre, producono composti ad attività antimicrobica e

modulano la risposta immunitaria dell'ospite, contribuendo alla protezione nei confronti di infezioni batteriche e fungine a livello vaginale (Avitabile et al., 2024).

Uno dei principali meccanismi protettivi è la produzione di acido lattico. Questo processo consente di mantenere un ambiente acido, con pH generalmente ≤ 4 , che limita la crescita dei microrganismi patogeni. L'acido lattico esercita inoltre un'azione antimicrobica diretta nei confronti di batteri, funghi e virus, interferendo con le loro strutture e funzioni vitali (O'Hanlon et al., 2013; Avitabile et al., 2024).

Un ulteriore meccanismo è rappresentato dalla **produzione di perossido di idrogeno** (H_2O_2) da parte di alcuni ceppi di lattobacilli. Questa sostanza possiede attività antimicrobica e contribuisce alla riduzione della sopravvivenza dei microrganismi patogeni attraverso meccanismi ossidativi (Avitabile et al., 2024).

I lattobacilli secernono inoltre le **batteriocine**, ovvero piccoli peptidi ad attività antimicrobica target-specifica che inibiscono la crescita dei batteri opportunisti e riducono la formazione di biofilm, ostacolando così la colonizzazione del tratto vaginale.

Nel complesso, tali meccanismi contribuiscono a mantenere l'equilibrio dell'ambiente vaginale e a limitarne la suscettibilità alle infezioni. La loro alterazione, in particolare la riduzione dei lattobacilli, comporta la perdita della condizione di eubiosi e l'instaurarsi di quadri di disbiosi e suscettibilità alle infezioni.

1.3 DISBIOSI DEL MICROBIOTA CERVICO-VAGINALE

La disbiosi del microbiota cervico-vaginale rappresenta una condizione patologica o para-fisiologica dalla riduzione della componente dominata da *Lactobacillus* spp. e dall'alterazione dell'equilibrio ecologico locale (Borrego-Ruiz and Borrego, 2025). In condizioni di eubiosi, i lattobacilli contribuiscono al mantenimento di un ambiente

vaginale acido attraverso la produzione di acido lattico, limitando la crescita di microrganismi potenzialmente patogeni.

Quando tale equilibrio viene compromesso, si osserva una riduzione dei lattobacilli e un aumento della diversità microbica (Han et al., 2021), con conseguente perdita delle condizioni di protezione dell'ecosistema vaginale e maggiore suscettibilità a infezioni genitali e sessualmente trasmissibili.

Questa alterazione si associa a un incremento del pH vaginale e alla proliferazione di microrganismi opportunisti, tra cui batteri coinvolti nella vaginosi batterica e lieviti come *Candida spp.*, contribuendo allo sviluppo di infezioni vaginali ricorrenti (Fong Amaris et al., 2024).

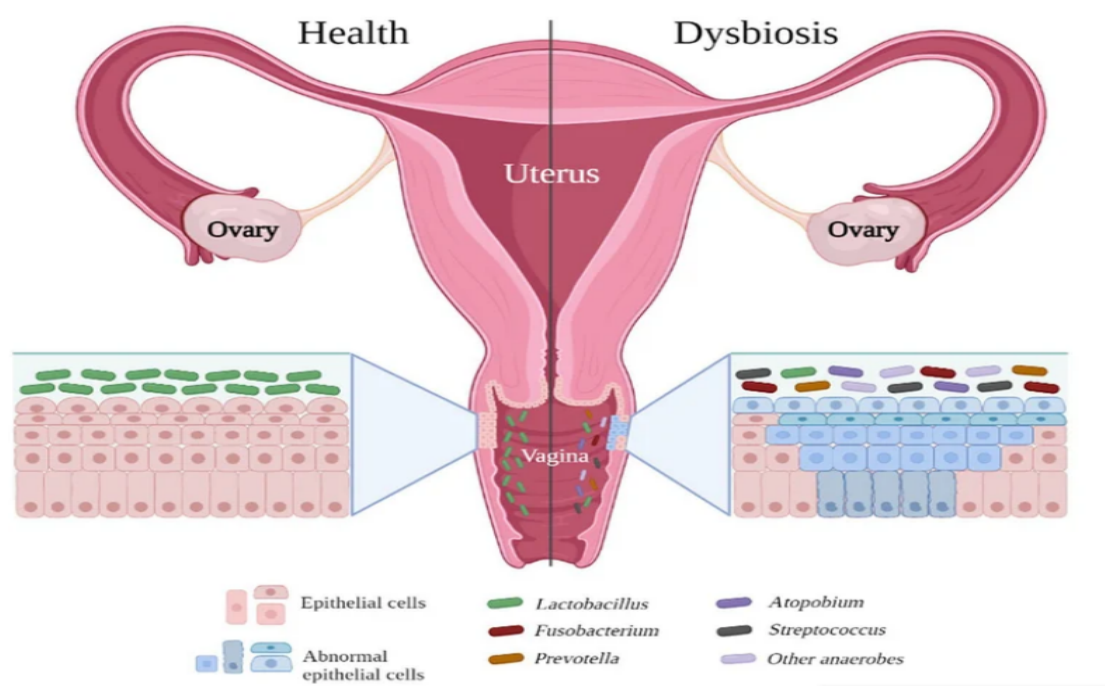


Figura 2. Rappresentazione schematica dell'apparato riproduttivo femminile in condizioni di eubiosi (Health) e disbiosi (Dysbiosis). A sinistra, l'epitelio vaginale sano e integro, a destra, lo stato disbiotico (Fonte: Fong Amaris et al., 2024)

Dal punto di vista clinico, la disbiosi può manifestarsi con secrezioni vaginali anomale, prurito, bruciore e dispareunia. La diagnosi si basa su valutazioni cliniche e microbiologiche, come esame del secreto vaginale e tampone cervico-vaginale, eventualmente integrati da analisi del microbiota. Il trattamento dipende dall'eziologia e può includere antibiotici o antimicotici, talvolta associati a probiotici volti a favorire il ripristino dell'equilibrio microbico.

La disbiosi del microbiota cervico-vaginale costituisce una condizione di squilibrio che aumenta la suscettibilità allo sviluppo di infezioni vaginali.

1.4. INFEZIONI CERVICO-VAGINALI CORRELATE ALLA DISBIOSI

Le infezioni cervico-vaginali costituiscono un gruppo di disturbi a carico dell'apparato genitale femminile e rappresentano una delle principali cause di consulto in ambito ginecologico (Maria et al., 2013).

Dal punto di vista epidemiologico, si tratta di condizioni estremamente diffuse, con una prevalenza che supera il 25% nelle donne sottoposte a visita specialistica (Quan, 2010). L'eziologia di tali quadri clinici è eterogenea e può includere agenti patogeni di natura batterica, fungina o virale.

Alla luce della natura prettamente batterica dei campioni analizzati nel presente lavoro sperimentale, nel paragrafo successivo verrà approfondita nello specifico la **vaginosi batterica**, in quanto forma più frequente e rappresentativa di disbiosi di origine batterica.

1.4.1 La vaginosi batterica

La vaginosi batterica (BV) rappresenta la causa più comune di secrezioni vaginali nelle donne in età riproduttiva ed è considerata l'infezione vaginale più diffusa a livello globale

(Mashburn, 2012; Dubé-Zinatelli et al., 2025). La sua eziopatogenesi non è ancora completamente chiarita, ma è caratterizzata da un'alterazione dell'ecosistema vaginale con riduzione dei lattobacilli e proliferazione di microrganismi, tra cui, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp., *Prevotella* spp. e *Mobiluncus* spp. (WHO, 2025). I lattobacilli svolgono un ruolo protettivo fondamentale attraverso la produzione di acido lattico, perossido di idrogeno e batteriocine, contribuendo al mantenimento di pH acido; la loro riduzione favorisce l'instaurarsi di condizioni predisponenti all'infezione.

I microrganismi associati alla vaginosi batterica producono enzimi capaci di degradare la barriera mucosa dell'epitelio vaginale e cervicale e sostanze pro-infiammatorie correlate a complicanze quali parto pretermine, malattia infiammatoria pelvica (PID) ed aumento della suscettibilità ad altre infezioni sessualmente trasmesse (CDC, 2021). Dal punto di vista clinico, le manifestazioni più frequenti includono perdite vaginali omogenee, sottili o grigio-biancastre associate ad odore sgradevole; tuttavia, una quota significativa di donne può risultare asintomatica (Mashburn, 2012).

La diagnosi si basa principalmente sul sistema di punteggio Nugent e sui criteri di Amsel. Il **punteggio di Nugent** valuta la composizione del microbiota vaginale attraverso l'esame microscopico di strisci colorati con il metodo di Gram. Questo sistema quantifica i diversi morfotipi batterici associando un punteggio da 0 a 10:

- un punteggio da 0 a 3 indica un microbiota sano;
- un punteggio da 7 a 10 indica la presenza di BV;
- un punteggio da 4 a 6 rappresenta una condizione intermedia (Campisciano et al., 2021; Saraf et al., 2021; Dubé-Zinatelli et al., 2025)

I criteri **clinici di Amsel** invece richiedono la presenza di almeno 3 delle quattro caratteristiche per una diagnosi positiva. Le caratteristiche includono:

- pH vaginale superiore a 4,5;

- presenza di clue cells (cellule guida) all'osservazione microscopica a fresco (Figura 3);
- secrezioni caratteristiche;
- test dell'odore positivo con KOH (Saraf et al., 2021; Dubè-Zinatelli et al., 2025).

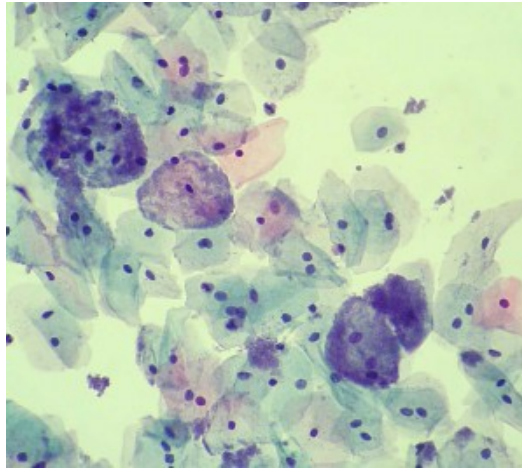


Figura 3. Immagine al microscopio di clue cells in corso di vaginosi batterica

1.4.2 Complicanze e conseguenze della vaginosa batterica

La vaginosi batterica (BV) è associata a diverse conseguenze sulla salute ginecologica e riproduttiva. L'alterazione del microbiota vaginale, caratterizzata principalmente dalla riduzione dei *Lactobacillus* e dalla proliferazione di specie batteriche anaerobie, è stata associata a una maggiore suscettibilità alle infezioni sessualmente trasmissibili (IST) e ad alcune complicanze del tratto genitale femminile. Tra queste sono state descritte condizioni quali cervicite, endometrite e salpingite, oltre alla malattia infiammatoria pelvica (PID). La BV è inoltre associata a esiti riproduttivi sfavorevoli, tra cui l'infertilità, e può contribuire alla compromissione della salute dell'apparato riproduttivo attraverso la diffusione dei microrganismi dal tratto genitale inferiore verso quello superiore (Dubè-Zinatelli et al., 2025). La relazione tra BV e infezioni sessualmente trasmissibili riveste particolare interesse clinico, poiché l'alterazione dell'ecosistema vaginale può ridurre i meccanismi di protezione normalmente garantiti da un microbiota dominata dai *Lactobacillus*. Di conseguenza, la

presenza di BV è stata associata a un aumento del rischio di acquisizione di diverse IST, tra cui infezioni da *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, virus dell'herpes simplex (HSV), virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e papillomavirus umano (HPV) (Dubé-Zinatelli et al., 2025)

1.4.3 Terapia antibiotica

La terapia antibiotica rappresenta, ad oggi, il trattamento standard di prima linea per la vaginosi batterica (VB). I farmaci più comunemente utilizzati sono il **metronidazolo** e la **clindamicina**, disponibili sia in formulazione orale che topica vaginale in forma di gel o crema, a cui si affiancano opzioni più recenti come **secnidazolo** e **tinidazolo**. Sebbene efficaci nel ridurre la carica batterica anaerobica patogena, queste terapie presentano importanti limitazioni. Il **metronidazolo**, pur agendo selettivamente sui patogeni senza danneggiare i lattobacilli, non è in grado di ripristinarne la dominanza all'interno del microbiota vaginale. La **clindamicina**, al contrario, riduce anche le popolazioni benefiche di *Lactobacillus* spp., fondamentali per il mantenimento di un ecosistema vaginale sano. L'incapacità di correggere tale squilibrio è alla base dell'elevato tasso di recidiva, che interessa fino al 50% delle donne entro 12 mesi dal trattamento. A ciò si aggiunge il crescente rischio di **antibiotico-resistenza** e gli effetti collaterali sistemici legati alla somministrazione orale, come la disbiosi intestinale, particolarmente rilevante in gravidanza (Dubé-Zinatelli et al., 2025).

In gravidanza, inoltre, l'uso di antibiotici per via orale, in particolare la clindamicina nel primo trimestre, è stato associato ad un aumentato rischio di malformazioni fetali. Per tale motivo la via vaginale è considerata preferibile, sebbene gli studi evidenzino come, pur alleviando i sintomi, la terapia antibiotica non riduca significativamente il rischio di parto pretermine (Dubé-Zinatelli et al., 2025).

1.5 TAMPONI CERVICO-VAGINALI NELLA DIAGNOSI DELLA DISBIOSI

Per identificare con precisione i microrganismi responsabili e valutare l'entità dell'alterazione microbica, è fondamentale eseguire esami mirati come i **tamponi cervico-vaginali**. Esistono due principali modalità di prelievo: il **tampone a secco**, utile per l'analisi molecolare (es. PCR, identificazione di DNA batterico/fungino), e il **tampone su terreno di coltura**, che consente la crescita e l'isolamento dei microrganismi patogeni. Quest'ultimo è particolarmente indicato in caso di infezioni persistenti o recidivanti, poiché permette anche di eseguire un **antibiogramma**, orientando la terapia in modo più efficace. La scelta del tipo di tampone dipende dal sospetto clinico e dall'analisi che si intende effettuare, e riveste un ruolo centrale nella diagnosi delle infezioni correlate alla disbiosi vaginale.

1.5.1 Tampone a secco e con terreno di coltura: differenze diagnostiche

Il **tampone a secco** (Figura 4) è un metodo di prelievo che non prevede l'immersione del campione in un mezzo liquido o terreno di coltura. Questo tipo di tampone è particolarmente indicato per le analisi molecolari volte all'individuazione di **infezioni sessualmente trasmesse (STI)**, come *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* e altri patogeni. Infatti, il tampone a secco permette di conservare meglio il materiale genetico, favorendo tecniche sensibili come la **PCR** (reazione a catena della polimerasi), che identificano il DNA o RNA del microrganismo anche in quantità molto basse.



Figura 4. Tampone a secco per il prelievo del campione cervico-vaginale

Al contrario, il **tampone con terreno di coltura** (Figura 5) è immerso in un mezzo nutritivo che consente la crescita dei microrganismi prelevati. È fondamentale per isolare e identificare batteri o funghi patogeni, come nel caso di infezioni ricorrenti o resistenti, poiché permette anche di eseguire test di sensibilità agli antibiotici (**antibiogramma**). Questo tipo di tampone è dunque utile per una diagnosi più completa e per orientare la terapia.



Figura 5. Tampone con terreno di coltura

Nel laboratorio in cui è stato svolto lo stage, venivano esaminati principalmente tamponi con terreno di coltura, in quanto non si effettuavano indagini molecolari per le infezioni sessualmente trasmesse (STI). I tamponi STI, infatti, venivano inviati a laboratori esterni specializzati, poiché la struttura non era dotata delle apparecchiature necessarie per eseguire analisi di tipo molecolare. L'attività diagnostica interna si concentrava quindi sull'isolamento e sulla coltura dei microrganismi, con l'obiettivo di identificare gli agenti patogeni responsabili di infezioni vaginali e di valutarne la sensibilità agli antibiotici. Per questo motivo, i tamponi a secco non rientravano tra le procedure eseguite di routine all'interno del laboratorio.

2. SCOPO DEL LAVORO

Il presente elaborato si inserisce nell'ambito dell'esperienza di tirocinio curriculare svolta presso il laboratorio di Microbiologia del Gruppo CIDIMU di Alessandria.

L'elaborato ha come oggetto lo studio della casistica dei tamponi vaginali pervenuti presso la struttura di riferimento durante l'anno 2025, con l'obiettivo di analizzare in maniera sistematica i dati microbiologici ottenuti.

L'analisi è stata orientata alla descrizione dei microrganismi identificati nei campioni e alla valutazione della loro frequenza all'interno della popolazione femminile considerata.

Una seconda parte dello studio è stata dedicata agli isolati batterici, per i quali sono stati analizzati i relativi profili di sensibilità agli antibiotici. L'analisi dell'antibiogramma ha consentito di valutare i profili di sensibilità dei microrganismi nei confronti degli antimicrobici testati e di evidenziare gli eventuali fenomeni di resistenza osservati.

3. MATERIALI E METODI

Il presente capitolo descrive le principali procedure microbiologiche utilizzate per l'analisi dei tamponi cervico-vaginali. Le fasi analitiche comprendono l'accettazione e la gestione del campione, la semina su specifici terreni di coltura e le successive analisi microbiologiche e strumentali.

3.1 RACCOLTA DEL TAMPONE: CHECK-IN E GESTIONE DEL CAMPIONE

I tamponi cervico-vaginali, pervenuti al laboratorio già prelevati presso i punti prelievo esterni, sono stati sottoposti a fase di accettazione (check-in) e registrazione.

Al momento dell'arrivo in laboratorio, ciascun campione è stato sottoposto alla verifica della corretta identificazione, della corrispondenza tra la richiesta medica e il contenitore, dell'integrità del dispositivo di raccolta e delle modalità di trasporto previste dalle procedure operative interne. Verificata l'idoneità del campione, si è proceduto con l'accettazione e il conseguente inserimento dei campioni nel sistema gestionale.

L'attività analitica si è concentrata principalmente sull'esame microbiologico mediante tecniche di coltura su differenti terreni di crescita. In base alla tipologia di richiesta diagnostica, i campioni sono stati avviati a percorsi analitici differenti.

Le indagini molecolari finalizzate alla ricerca di agenti patogeni responsabili di infezioni sessualmente trasmesse (IST) non sono state eseguite internamente, in quanto la struttura non dispone di strumentazioni per la diagnostica molecolare. Tali campioni, come da prassi operativa, sono stati pertanto inviati a laboratori esterni specializzati di riferimento.

3.2 SEMINA SU PIASTRA

Dopo la fase di accettazione e gestione, i tamponi cervico-vaginali sono stati sottoposti a semina su differenti terreni di coltura, selezionati in funzione dei microrganismi di interesse. In particolare, sono stati utilizzati i terreni Columbia Agar +5% sheep blood (COS), Columbia Agar 5% blood (CNA), MacConkey Agar (MCK) e Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 Agar (SGC2).

3.2.1 Columbia Agar +5% sheep blood (COS)

Il Columbia Agar addizionato con il 5% di sangue di montone (Figura 1) è un terreno altamente nutritivo e non selettivo, idoneo alla crescita sia dei batteri Gram-positivi che Gram-negativi. La base Columbia è formulata con peptoni di caseina, carne e cuore e proteine animali idrolizzate, arricchita con amido di mais e cloruro di sodio. Questa composizione lo rende particolarmente adatto a supportare la crescita dei microrganismi più esigenti, come gli streptococchi.

La presenza del sangue di montone permette due cose: da un lato aumenta ulteriormente il potere nutritivo del terreno, consentendo la crescita della maggior parte delle specie batteriche indipendentemente dal loro metabolismo, dall'altro permette di visualizzare l'attività emolitica. In particolare, sulla base del tipo di emolisi osservabile intorno alle colonie è possibile fare un primo orientamento diagnostico: alfa-emolisi caratterizzata dalla comparsa di un alone verdastro e, beta-emolisi, caratterizzata dalla presenza di un alone trasparente intorno e al di sotto della colonia. Infine, può verificarsi la gamma-emolisi, caratterizzata dall'assenza di un alone intorno alla colonia.



Figura 1. Piastra di Columbia Agar + 5% sheep blood (COS) (<https://cbsalife.com/wp-content/uploads/2022/01/Sheep-Blood-Columbia-2.jpg>)

3.2.2 MacConkey Agar (MCK)

Il MacConkey agar (Figura 2) è un terreno di coltura selettivo e differenziale utilizzato per l'isolamento dei batteri Gram-negativi. La selettività è determinata dalla presenza di cristalvioletto e sali biliari, che inibiscono prevalentemente la crescita dei batteri Gram-positivi.

L'agar Mac Conkey contiene, inoltre, il lattosio come unica fonte di carboidrati ed il rosso neutro (un colorante che vira al rosso allorché il pH del mezzo scende al di sotto di 6,8). I batteri che fermentano il lattosio si presentano sotto forma di colonie con varie sfumature di rosso poiché producono acidi misti che fanno scendere il pH. Invece, i batteri non fermentanti formano colonie trasparenti od incolori. A seconda dell'intensità della fermentazione si possono distinguere vari gruppi di batteri:

- batteri fortemente fermentanti il lattosio che producono colonie di colore rosso con un'area circostante di precipitazione dei sali biliari (ad esempio *Escherichia*);
- batteri fermentanti il lattosio seguendo la via 2,3-butilenglicole producono colonie rosse senza la precipitazione dei sali biliari (ad esempio *Enterobacter*, *Klebsiella*);

- batteri debolmente fermentanti il lattosio che formano colonie che possono apparire, dopo 24 ore, incolori per poi diventare lievemente rosate tra le 24 e le 48 ore (ad esempio *Citrobacter*).



Figura 1. Piastra di MacConckey agar seminata con batteri fermentanti il lattosio

3.2.3 Columbia Agar + colistina e acido nalidixico + 5% sheep blood (CNA)

Il Columbia Agar (CNA) con il 5% di sangue di montone (Figura 3) è un terreno selettivo utilizzato per l'isolamento e la differenziazione di batteri Gram-positivi, come streptococchi, stafilococchi e pneumococchi. La sua formulazione sfrutta una combinazione di nutrienti e agenti selettivi. La base Columbia, arricchita con peptidi speciali, fornisce i fattori nutritivi necessari alla crescita dei microrganismi più esigenti. L'aggiunta di sangue defibrinato di montone al 5% aumenta ulteriormente il potere nutritivo del terreno e permette di evidenziare le reazioni emolitiche delle colonie. La selettività è garantita dalla presenza di colistina e acido nalidixico, che inibiscono la crescita dei batteri Gram-negativi, favorendo così lo sviluppo selettivo dei Gram-positivi.

3.2.4 Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 Agar (SGC2)

Il Sabouraud Cloramfenicolo Gentamicina 2 Agar (Figura 3) è un terreno utilizzato per l'isolamento di lieviti e funghi filamentosi da campioni biologici caratterizzati dalla possibile presenza di flora fungina e batterica mista.

La crescita dei funghi è favorita dalla presenza di peptoni e glucosio, mentre gentamicina e cloramfenicolo inibiscono la crescita della maggior parte dei batteri, tra i quali *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*.

Il terreno SGC2 è stato utilizzato nell'ambito del percorso analitico dei campioni; tuttavia, i risultati relativi alla crescita fungina non sono stati considerati nelle successive analisi oggetto del presente studio.

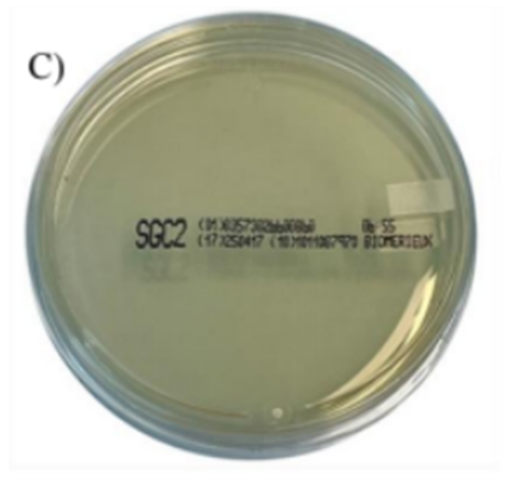


Figura 3. Piastra di Sabouraud Cloramfenicolo Gentamicina 2 Agar usata per il rilevamento dei miceti

3.2.5 Procedura di semina e incubazione

La procedura di semina ha previsto l'impiego di un'ansa da 10 μL (Figura 5) per il prelievo del campione, successivamente depositato sulla superficie della piastra e distribuito mediante la tecnica della semina a quattro quadranti, al fine di favorire l'isolamento delle singole colonie batteriche.



Figura 5. Anse da 10 μL usate per la semina dei campioni sulle piastre imbustate in condizioni di sterilità

Le piastre sono state quindi incubate in termostato (Figura 6) a 37°C per un periodo di 48 ore, al fine di consentire lo sviluppo dei microrganismi. La lettura dei risultati viene effettuata quotidianamente.



Figura 6. Termostato utilizzato per l'incubazione delle piastre subito dopo la semina

3.3 ANALISI MICROSCOPICA

Parallelamente all'esame colturale, è stata effettuata la preparazione e la successiva colorazione dei vetrini secondo la metodica di Gram, con l'obiettivo di distinguere i batteri Gram-positivi da quelli Gram-negativi, in base alla colorazione assunta dalla parete cellulare. Infatti, la colorazione di Gram consente di distinguere i batteri sulla base della loro capacità di trattenere il colorante primario cristal-violetto. I batteri **Gram-positivi** assumono una colorazione blu-violacea, mentre i **Gram-negativi** assumono una colorazione rosso-rosata (Figura 7).

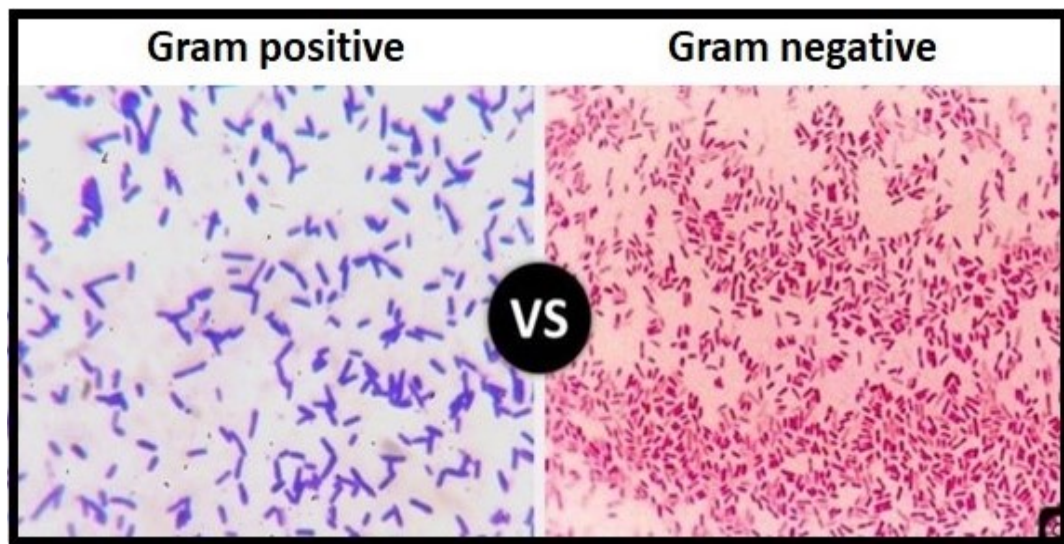


Figura 7. Batteri Gram-positivi e batteri Gram-negativi osservati al microscopio dopo colorazione di Gram (<https://upbiotech.wordpress.com/2018/09/30/colorazione-di-gram>)

Oltre alla classificazione in base alla colorazione, l'esame microscopico consente di valutare la morfologia cellulare, distinguendo principalmente bacilli e cocci, e la disposizione delle cellule, ad esempio in grappoli, catene o diplococchi. Sono stati inoltre valutati la presenza e l'abbondanza dei leucociti polimorfonucleati e degli altri elementi cellulari presenti nel campione.

La presenza di leucociti polimorfonucleati può essere valutata come indicatore di una componente infiammatoria e interpretata in associazione agli altri reperti microbiologici.

3.3.1 Colorazione di Gram

La colorazione di Gram è stata eseguita secondo la seguente procedura:

1. Preparazione del vetrino mediante deposito di 30 μ L di campione e fissazione mediante calore o etanolo;
2. Applicazione della colorazione primaria con cristal-violetto, seguita da risciacquo;
3. Aggiunta del mordenzante (reagente di Lugol) e nuovo risciacquo;
4. Decolorazione tramite alcol e successivo risciacquo;
5. Applicazione della colorazione secondaria con safranina, seguita da un ultimo risciacquo e asciugatura del vetrino.



Figura 8. Coloranti utilizzati per lo svolgimento della colorazione di Gram

3.3.2 Esame microscopico

Dopo la colorazione di Gram, i vetrini sono stati osservati al microscopio ottico, generalmente a un ingrandimento di 100x, utilizzando l'obiettivo a immersione in olio, al fine di valutare la morfologia, la disposizione e l'abbondanza relativa dei diversi elementi cellulari e batterici presenti nel campione.

L'osservazione ha consentito di distinguere i principali morfotipi associati alla flora vaginale, quali lattobacilli (bastoncelli Gram-positivi), *Gardnerella vaginalis*, leucociti polimorfonucleati, miceti e diplococchi. La presenza e la distribuzione forniscono indicazioni sull'equilibrio della microflora e sull'eventuale presenza di un processo infettivo o infiammatorio.

Per ciascun campione, il referto microscopico è stato espresso secondo uno schema di valutazione semiquantitativa, mediante una scala ad intensità crescente:

- assente (ASS);
- raro (+);
- alcuni (++)
- numerosi (+++);
- a tappeto (++++).

Per miceti e diplococchi è stata riportata la presenza o assenza (PRE/ASS). Lo schema di valutazione adottato è riportato in Figura 9.

Esame microscopico					
▪ Tampone cervico-vaginale					
Leucociti (TCVLE)	ASS	+ (rari)	++ (alcuni)	+++ (numerosi)	++++ (tappeto)
Lattobacilli (LACT)	ASS	+ (rari)	++ (alcuni)	+++ (numerosi)	++++ (tappeto)
Gardnerella (GARD)*	ASS	+ (rari)	++ (alcuni)	+++ (numerosi)	++++ (tappeto)
Miceti (MICET)	ASS	PRE			
Diplococchi (DIPLO)	ASS	PRE			

*se Clue cells presenti, segnalarlo in nota

Figura 9. Criteri semiquantitativi per la valutazione dei principali reperti osservati all'esame microscopico dei tamponi cervico-vaginali

Qualora siano state identificate **clue cells**, ovvero cellule epiteliali ricoperte da numerosi coccobacilli aderenti alla superficie, tale reperto è stato segnalato in nota in quanto di rilevanza diagnostica nell'ambito della valutazione della flora vaginale.

3.4 IDENTIFICAZIONE BATTERICA MEDIANTE SISTEMA VITEK 2

In presenza di crescita batterica, i microrganismi isolati sono stati analizzati tramite la piattaforma automatizzata VITEK 2. Il sistema ne permette l'identificazione batterica attraverso l'impiego di card specifiche contenenti un pannello di test biochimici; parallelamente, l'utilizzo di card dedicate consente la determinazione della suscettibilità agli agenti antimicrobici (Garcia-Garrote et al., 2000) (Figura 10).

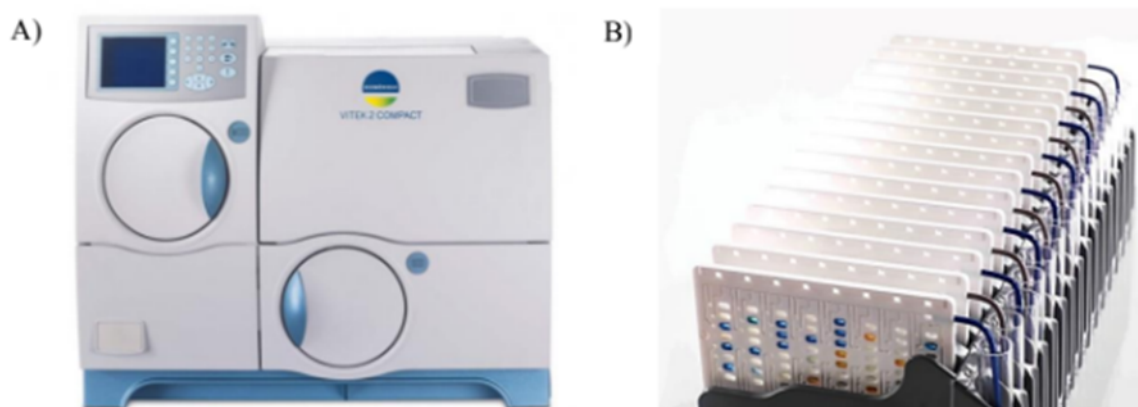


Figura 10. Sistema automatizzato per identificazione e antibiogramma, VITEK 2. A sinistra (A) l'analizzatore e a destra (B) le card di reazioni con pozzetti per i test microbiologici

La procedura analitica ha previsto le seguenti fasi:

1. **Preparazione dell'inoculo batterico:** le colonie isolate dai terreni di coltura sono state sospese in 3 ml di soluzione fisiologica fino al raggiungimento della densità ottica standardizzata, misurata tramite densi CHECK. Per i batteri è stato utilizzato un

intervallo compreso tra 0.5 e 0.63 McFarland, mentre per i miceti è stato utilizzato un intervallo compreso tra 1.80 e 2.20 McFarland.

2. **Caricamento delle card VITEK:** l'inoculo è stato trasferito nelle card specifiche per l'identificazione (GN, GP, YST), e/o nelle card dedicate al test di sensibilità agli antibiotici, tra cui AST 659, 658, ST-03 e N437.
3. **Incubazione e lettura automatizzata:** una volta completata la cassetta, questa viene inserita nello strumento, che ha avviato automaticamente le fasi di identificazione e valutazione della sensibilità agli antibiotici. Il tempo di analisi risulta in un intervallo di tempo variabile tra 6 e 18 ore.
4. **Interpretazione dei risultati:** i dati ottenuti sono stati elaborati dal software del sistema, che ha restituito l'identificazione del microrganismo con un livello di affidabilità statistica, oltre al profilo di sensibilità agli antibiotici, classificando i ceppi come **sensibili (S)**, **intermedi (I)** o **resistenti (R)** secondo gli standard internazionali CLSI/EUCAST.

Accanto ai risultati ottenuti tramite il sistema VITEK 2, un parametro fondamentale nella valutazione della sensibilità antibiotica è rappresentato dalla Concentrazione Minima Inibente (MIC), il cui approfondimento richiede l'utilizzo di metodiche dedicate, come l'E-test.

3.5 CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC)

La concentrazione minima inibente (**MIC**) è definita come la più bassa concentrazione di un antibiotico, espressa generalmente in mg/L, in grado di inibire la crescita visibile di un microrganismo in condizioni di laboratorio standardizzate.

La MIC può essere determinata mediante differenti metodiche tra cui:

- ❖ **Metodi di diluizione**, in agar o in brodo;
- ❖ **Metodi a gradiente**, che utilizzano strisce contenenti con un gradiente predefinito di concentrazione di antibiotico, come nel caso dell'E-test.

Il valore di MIC ottenuto viene confrontato con specifici valori soglia, detti “**breakpoint clinici**”, stabiliti dalle linee guida di organismi di riferimento, quali l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) o il CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

L'interpretazione della sensibilità antimicrobica prevede le seguenti categorie:

1. **SENSIBILE (S)**: alta probabilità di successo terapeutico con la posologia standard;
2. **SENSIBILE, CON AUMENTATA ESPOSIZIONE (I)**: alta probabilità di successo terapeutico aumentando la dose o modificando la via di somministrazione;
3. **RESISTENTE (R)**: alta probabilità di fallimento terapeutico anche in condizioni di aumentata esposizione.

La determinazione della MIC fornisce un'informazione quantitativa rispetto ai soli metodi qualitativi, orientando il clinico nella scelta del farmaco e del dosaggio più efficaci, in particolare nei casi di sensibilità intermedia o di resistenze dubbie (Kowalska-Krochmal e Dudek-Wicher, 2021).

Dopo aver definito il concetto di MIC e la sua importanza nella valutazione della sensibilità agli antimicrobici, è utile considerare le principali metodiche attraverso cui questo parametro può essere determinato. Tra queste, l'E-test, rappresenta una tecnica particolarmente utilizzata, in quanto permette di ottenere direttamente una stima della MIC.

3.5.1 Epsilometer test (E-test)

L'E-test (Epsilometer test) rappresenta una tecnica quantitativa a "gradiente esponenziale" impiegata per la determinazione diretta della resistenza e della suscettibilità antimicrobica nei microrganismi. Tale metodo integra la semplicità operativa della diffusione in agar su disco con la precisione analitica della microdiluizione, consentendo di determinare direttamente la **Concentrazione Minima Inibente (MIC)**, ovvero la minima concentrazione di antimicrobico espressa in $\mu\text{g/mL}$ capace di inibire la crescita visibile del ceppo in esame.

Principio del metodo:

Il saggio utilizza strisce sottili e flessibili contenenti un gradiente continuo ed esponenziale di concentrazione dell'agente antimicrobico. La superficie superiore della striscia riporta invece una scala graduata, generalmente espressa in $\mu\text{g/mL}$.

Nel momento in cui la striscia viene posizionata sulla piastra di agar, tipicamente Mueller-Hinton Agar (MHA), precedentemente inoculata con una sospensione batterica standardizzata, l'antimicrobico si diffonde immediatamente nel terreno. Il gradiente di concentrazione stabile che si genera attorno alla striscia inibisce la proliferazione microbica: a seguito dell'incubazione, si sviluppa una zona di inibizione simmetrica a forma di ellisse. Il valore di MIC corrisponde al punto in cui il bordo dell'ellisse interseca la scala numerica graduata della striscia (Figura 11).

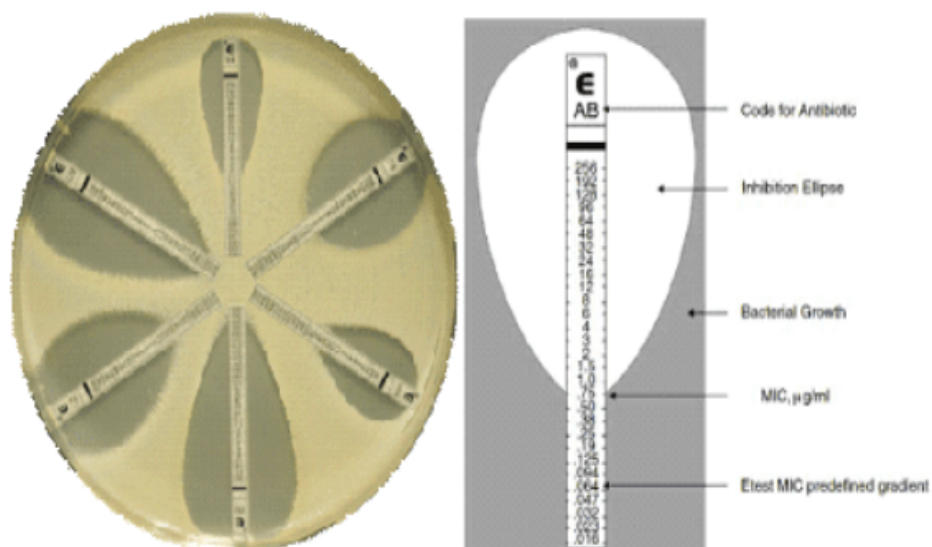


Figura 11. E-test su piastra di Mueller Hinton Agar (www.biomerieux-diagnostics.com/etest)

Procedura operativa:

- **Preparazione dell'inoculo:** Le strisce conservate a -20 °C vengono portate a temperatura ambiente circa 30 minuti prima dell'uso. Si prelevano da una coltura pura 3–4 colonie ben isolate, sospendendole in soluzione fisiologica fino a raggiungere un'opacità equivalente allo standard di torbidità **0,5 McFarland**.
- **Inoculazione:** Un tampone di cotone sterile viene immerso nella sospensione, strizzato lungo la parete interna della provetta per eliminare il liquido in eccesso e strofinato omogeneamente su tutta la superficie della piastra MHA ruotandola di 60° tra una passata e l'altra. Prima dell'applicazione delle strisce, la piastra viene lasciata ad asciugare per circa 5 minuti.
- **Applicazione e incubazione:** Mediante pinze sterili, le strisce vengono posizionate sulla superficie dell'agar con l'estremità contrassegnata dal codice dell'antibiotico (o dalla lettera "E") rivolta verso il bordo della piastra e la scala graduata orientata verso l'alto. Le piastre vengono quindi incubate a 37 °C per 18–24 ore.

Interpretazione dei risultati e breakpoint:

La lettura viene eseguita osservando la piastra dall'alto. La MIC si rileva nel punto di inibizione completa della crescita batterica in cui l'ellisse incontra il bordo della striscia. Nel caso in cui l'intersezione cada tra due valori della scala, il risultato viene arrotondato per eccesso alla concentrazione superiore. I valori di MIC così determinati vengono successivamente categorizzati come **Sensibile (S)**, **Sensibile con aumentata esposizione (I)** o **Resistente (R)** mediante il confronto con i breakpoint stabiliti dalle linee guida internazionali di riferimento (es. CLSI o EUCAST).

4. RISULTATI

Nel corso dell'anno 2025 sono pervenuti presso il laboratorio di Microbiologia del Gruppo CIDIMU di Alessandria complessivamente 510 tamponi cervico-vaginali, sottoposti a esame colturale secondo il protocollo descritto nel capitolo Materiali e Metodi.

4.1 ESITI COLTURALI DEI TAMPONI CERVICO-VAGINALI

Sul totale di 510 campioni analizzati, 211 sono risultati positivi, evidenziando la presenza di almeno un microrganismo, mentre 299 campioni sono stati classificati come negativi. Nel complesso, i campioni positivi rappresentano il 41,4% del totale, mentre quelli negativi costituiscono il 58,6%. Questa prima distinzione consente di fornire una visione generale dell'esito delle analisi microbiologiche. La distribuzione dei campioni è riportata in Grafico 1.

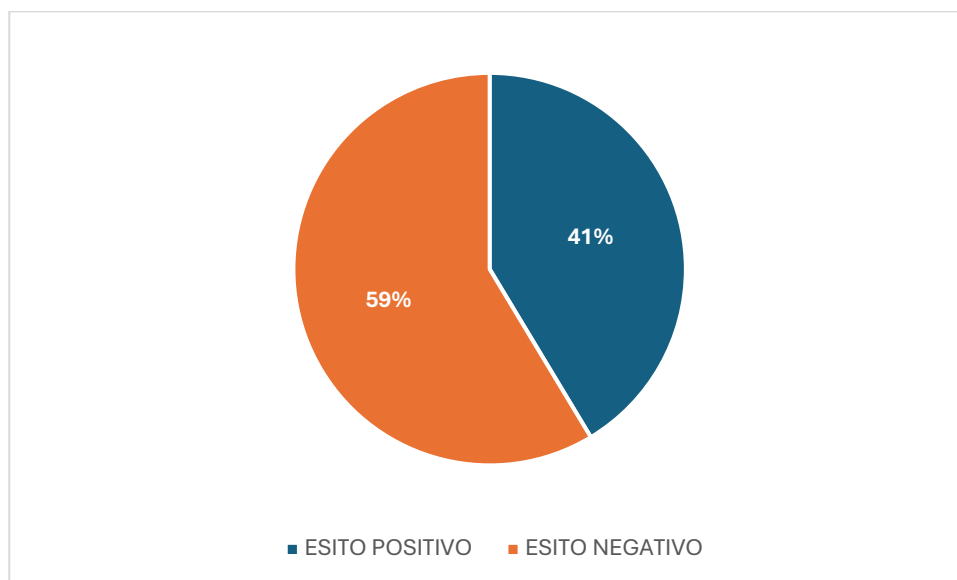


Grafico 1: Distribuzione dei 510 campioni analizzati in relazione all'esito della ricerca microbiologica

Nel dettaglio, i 299 campioni non classificati come comprendevano differenti tipologie di esito. In particolare, 249 campioni presentavano flora batterica normalmente residente del

tratto cervico-vaginale, 46 campioni avevano esito negativo, 2 campioni riportavano un rinvio a documentazione allegata non disponibile, 1 campione non era pervenuto al laboratorio e 1 campione risultato positivo per *Candida* spp. sulla base del solo referto testuale, privo però di identificazione di specie in banca dati e per questo qui conteggiato separatamente.

La distribuzione delle diverse tipologie di esito all'interno dei 299 campioni non classificati come positivi è riportata nel Grafico 2.

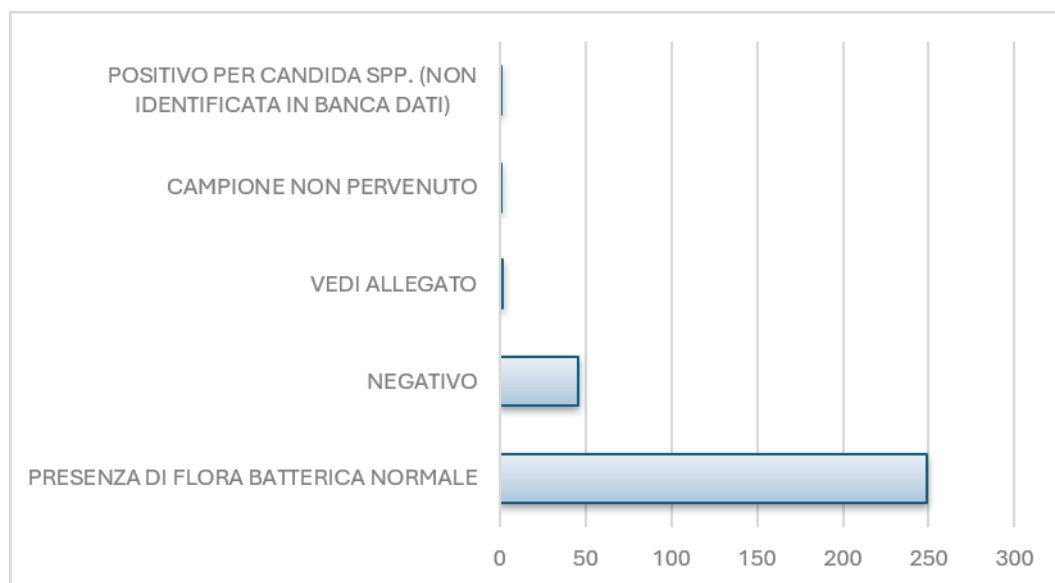


Grafico 2: Composizione dei 299 esiti non positivi: presenza di flora batterica normale, negativo, vedi allegato, campione non pervenuto, positivo per *Candida* spp. non identificata in banca dati.

4.2 DISTRIBUZIONE DEI CAMPIONI POSITIVI PER FASCIA DI ETÀ

I 211 campioni risultati positivi sono stati successivamente classificati in base alla fascia d'età delle pazienti, al fine di descriverne la distribuzione nella popolazione analizzata.

L'analisi della distribuzione per fascia d'età (Tabella 1) ha evidenziato una progressiva crescita del numero di campioni positivi a partire dalla fascia 11-20 anni, con un massimo osservato nella fascia 31-40 anni (n=84; 39,8% del totale dei campioni positivi). Successivamente al picco, si registra una riduzione progressiva della frequenza nelle fasce d'età supe-

riori, con valori pari a 29 casi (13,7%) nella fascia 41-50 anni e a 19 casi (9,0%) nella fascia 51-60 anni. Nella fascia d'età superiore ai 60 anni è stato osservato un lieve incremento, rispetto alla fascia immediatamente precedente, con 23 casi (10,9%).

Tabella 1: Distribuzione per fascia d'età dei campioni positivi (n=211)

FASCIA D'ETA'	N.CAMPIONI	% POSITIVI
0-10	0	0%
11-20	9	4,3 %
21-30	47	22,3 %
31-40	84	39,8%
41-50	29	13,7%
51-60	19	9,0%
+60	23	10,9%
TOTALE	211	100,0%

Nel complesso, la maggiore concentrazione di campioni positivi è stata osservata nelle fasce di età comprese tra i 21 e i 40 anni, con il picco nella fascia 31-40 anni come si può osservare dal Grafico 3.

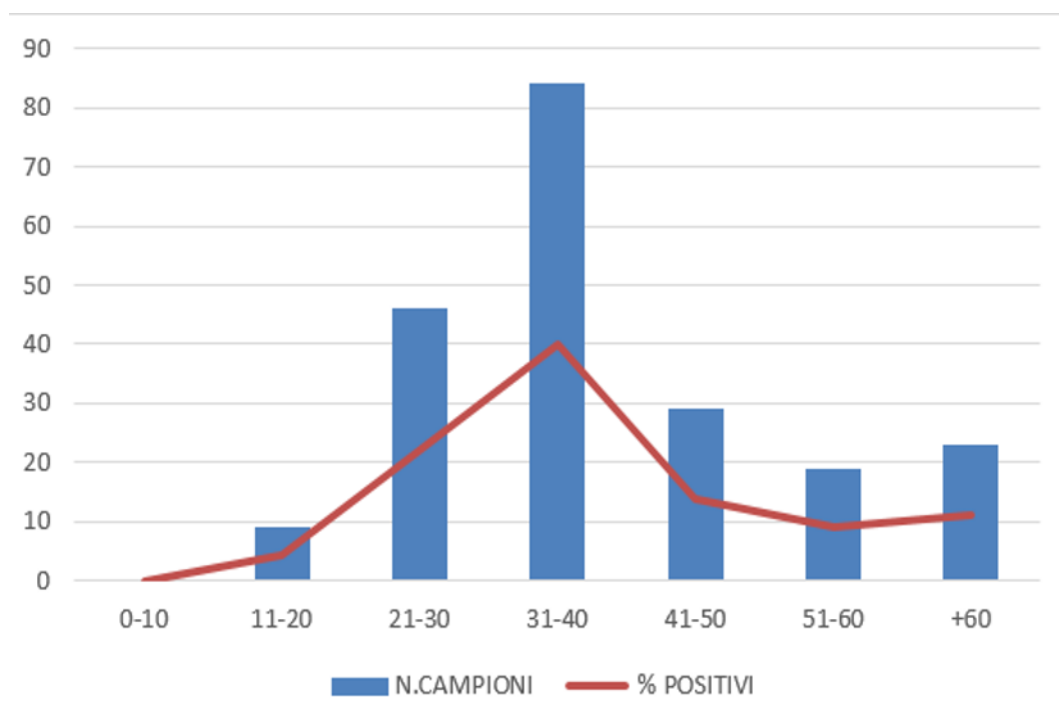


Grafico 3: Distribuzione per fascia d'età dei campioni positivi (n=211)

La distribuzione osservata risulta compatibile con il periodo di maggiore attività riproduttiva e con la conseguente più elevata frequenza di accesso a controlli ginecologici nella popolazione femminile in età fertile.

4.3 DISTRIBUZIONE DEI MICRORGANISMI NEI CAMPIONI POSITIVI

Dei 211 campioni positivi, **131** (62,1%) hanno evidenziato la presenza di un batterio, invece **80** (37,9%) hanno evidenziato la presenza di un micete (Grafico 4). La distribuzione evidenzia pertanto una maggiore frequenza dei microrganismi batterici rispetto a quelli fungini, pur mostrando una presenza rilevante di entrambe le categorie.

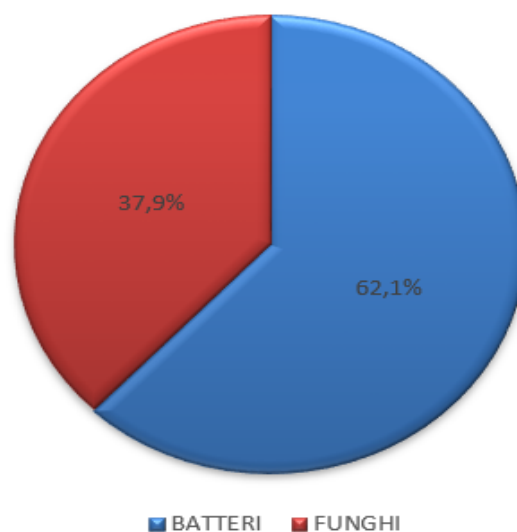


Grafico 4: Composizione dei campioni positivi: batteri (131; 62,1%) e funghi (80; 37,9%)

Tra i campioni risultati positivi alla ricerca di miceti, le specie maggiormente rappresentate erano *Candida albicans* e *Candida glabrata*, seguite da specie rilevate con frequenza minore, quali *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Candida sphaerica*, *Candida spp*, *Cryptococcus laurentii* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Poiché il presente lavoro è focalizzato sull'identificazione dei microrganismi batterici e sulla valutazione del loro profilo di sensibilità agli antibiotici, i miceti sono stati considerati nelle analisi successive. L'analisi prosegue pertanto prendendo in considerazione gli isolati batterici.

4.4 DISTRIBUZIONE DEGLI ISOLATI BATTERICI

Gli isolati batterici sono stati successivamente classificati in base alla colorazione di Gram.

Tra i **Gram-positivi** sono state identificate le specie *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Corynebacterium minutissimum*, *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*. Tra i **Gram-negativi** sono state invece identificate le specie *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas putida* e *Serratia ficaria*.

Nella Tabella 2 sono state riportate le specie identificate divise per Gram positivi e Gram negativi riscontrate nei campioni positivi.

Tabella 2: Batteri gram-positivi e gram-negativi

GRAM-POSITIVI	GRAM-NEGATIVI
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	<i>Citrobacter koseri</i>
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Hafnia alvei</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Serratia ficaria</i>

L'analisi della distribuzione delle specie batteriche ha evidenziato una maggiore frequenza di alcune specie rispetto alle altre. Come si può notare dal Grafico 5, *Gardnerella vaginalis* è risultata la specie maggiormente rappresentata, con 37 isolati (28,2%), seguita da *Escherichia coli* (25 isolati, 19,1%), *Streptococcus agalactiae* (21 isolati, 16%) ed *Enterococcus faecalis* (19 isolati, 14,5%). Le restanti specie identificate presentavano una frequenza inferiore.

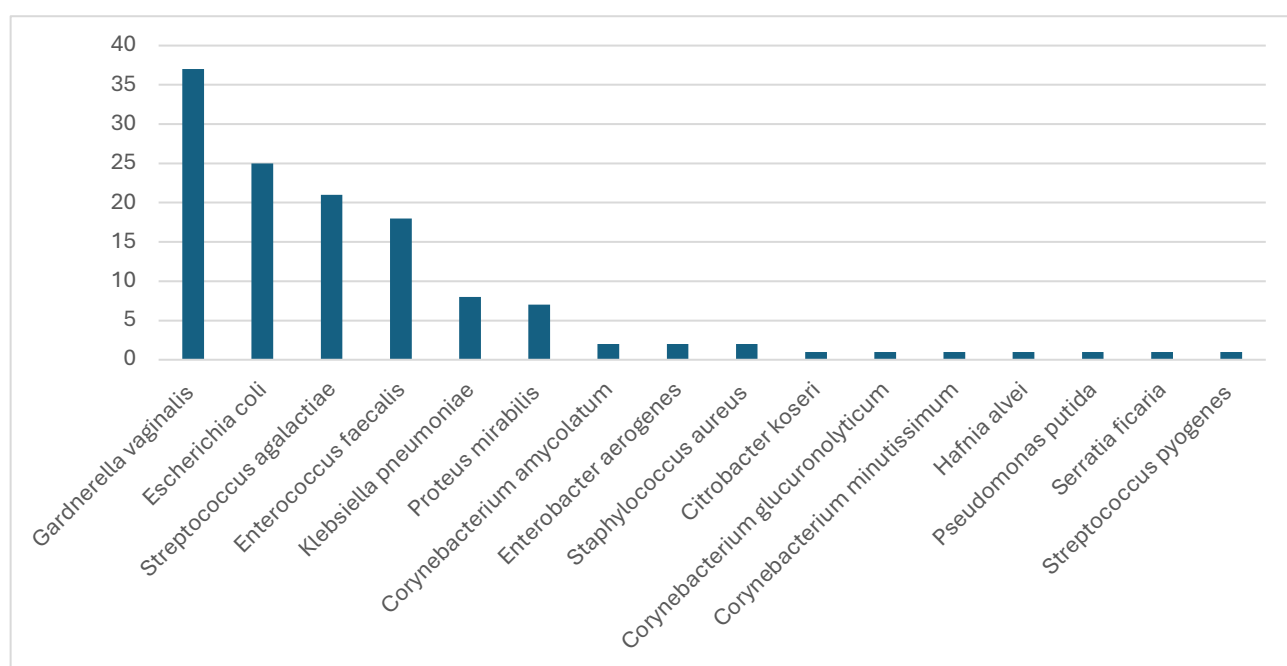


Grafico 5: Distribuzione delle diverse specie batteriche isolate (n=131)

4.5 CARATTERIZZAZIONE MICROBIOLOGICA E PROFILO DI SENSIBILITA' AGLI ANTIBIOTICI DEI PRINCIPALI ISOLATI BATTERICI

Per 93 dei 131 isolati batterici (**71,0%**) è stato possibile determinare il profilo di sensibilità agli antibiotici mediante E-test, con calcolo della Concentrazione Minima Inibente (MIC). Per ogni antibiotico, i ceppi vengono classificati come sensibili, intermedi o resistenti. Il

numero di isolati valutati può variare in funzione dell'antibiotico considerato; pertanto, i risultati sono riportati sulla base dei ceppi effettivamente testati.

Per quanto riguarda i restanti 38 isolati non sono disponibili profili di sensibilità. Nel dettaglio: 37 corrispondono a *Gardnerella vaginalis*, microrganismo per il quale il sistema VITEK 2 non prevede l'esecuzione dell'antibiogramma standard, e 1 corrisponde a un isolato di *Klebsiella pneumoniae* per cui il dato non è stato refertato.

Per l'analisi in dettaglio sono stati considerati i 5 microrganismi più frequentemente isolati nella casistica in esame, che risultano *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Per ciascuno di essi, oltre al profilo di sensibilità, sono stati valutati due parametri: i **lattobacilli**, come indicatori di eubiosi vaginale e i **leucociti**, come indicatori di flogosi.

4.5.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli è risultato, nella presente casistica, uno dei microrganismi batterici più frequentemente isolati, con 25 isolati.

Come mostrato nel Grafico 6, nei campioni positivi per *E.coli*, la componente lattobacillare è risultata prevalentemente ridotta: la categoria “alcuni” è stata osservata in 14 campioni, mentre la categoria “rari” in 9 campioni. L'assenza completa di lattobacilli e la presenza di una flora numerosa sono state riscontrate in un solo caso ciascuna.

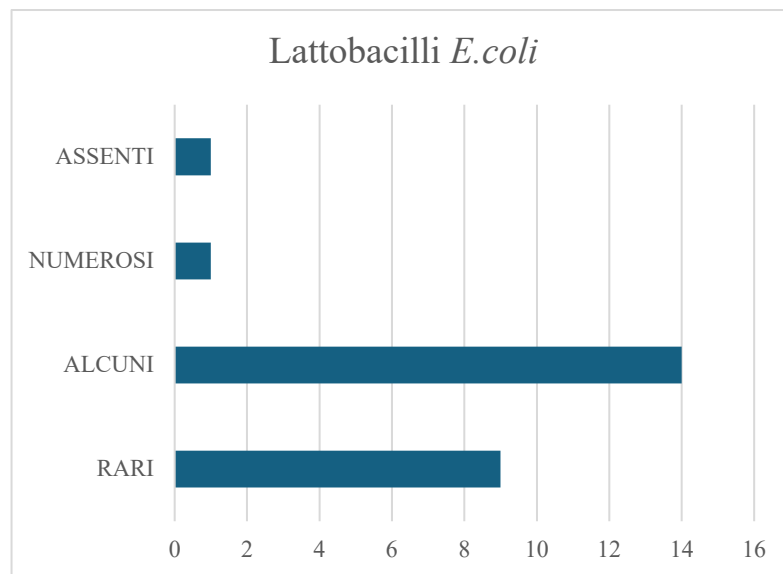


Grafico 6: Conta dei lattobacilli nei campioni positivi per *Escherichia coli*

Per quanto riguarda la componente leucocitaria, come si osserva nel Grafico 7, anche in questo caso la categoria “alcuni” è risultata quella maggiormente frequente con 14 campioni, seguita dalla categoria “rari” con 9 campioni. Anche per questa analisi è stato riscontrato un solo caso di assenza di leucociti e di leucociti numerosi.

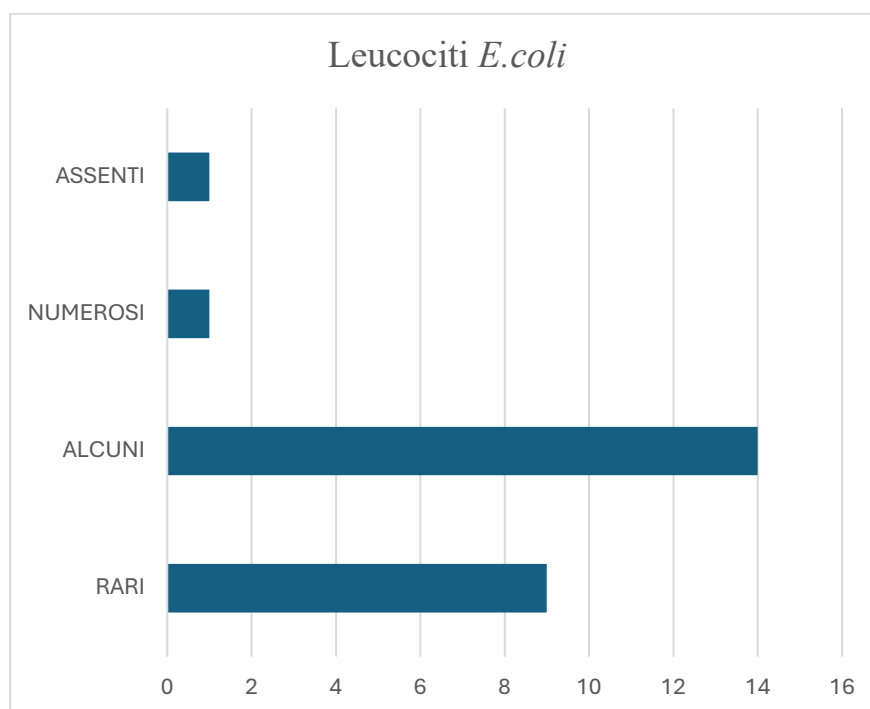


Grafico 7: Conta leucocitaria nei campioni positivi per *Escherichia coli*

Nel complesso, il quadro osservato in presenza di *E.coli* è compatibile con una condizione di disbiosi associata a flogosi di basso grado.

Per quanto riguarda il profilo di sensibilità agli antibiotici tra gli isolati di *E. coli*, nel complesso è stata osservata una prevalenza di ceppi sensibili, mentre i risultati resistenti risultavano concentrati verso un numero limitato di molecole. In particolare di questi ultimi la maggiore resistenza è stata osservata nei confronti dell'Ampicillina (tabella 3).

Tabella 3: Distribuzione del profilo di sensibilità agli antibiotici di *Escherichia coli*

ANTIBIOTICO	S	I	R
Amikacina	25	0	0
Amoxicillina/A.Clavulanico	16	0	9
Ampicillina	10	0	15
Ampicillina/Sulbactam	1	0	0
Cefalexina	19	0	6
Cefixima	19	0	6
Cefpodoxime	19	0	6
Ceftazidime	22	1	2
Ceftriaxone	22	0	3
Ciprofloxacina	19	0	6
Ertapenem	25	0	0
Fosfomicina	3	0	1
Gentamicina	24	0	1
Imipenem	0	1	0
Levofloxacina	19	2	4
Linezolid	1	0	0
Meropenem	25	0	0
Nitrofurantoina	25	0	0
Teicoplanina	1	0	0
Tigeciclina	1	0	0
Trimetoprim/Sulfametossazolo	17	0	8
Vancomicina	1	0	0

Nella Tabella 4 vengono riportate le percentuali di sensibilità, resistenza e sensibilità ad aumentata esposizione per le singole molecole testate in riferimento ai ceppi.

Tabella 4: Percentuale di ceppi Sensibili (S), Intermedi (I) e Resistenti (R) di *E.coli*

ANTIBIOTICO	% S	% I	% R
Amikacina	100	0	0
Amoxicillina/A.Clavulanico	64	0	36
Ampicillina	40	0	60
Ampicillina/Sulbactam	100	0	0
Cefalexina	76	0	24
Cefixima	76	0	24
Cefpodoxime	76	0	24
Ceftazidime	88	4	8
Ceftriaxone	88	0	12
Ciprofloxacina	76	0	24
Ertapenem	100	0	0
Fosfomicina	75	0	25
Gentamicina	96	0	4
Imipenem	0	100	0
Levofloxacina	76	8	16
Linezolid	100	0	0
Meropenem	100	0	0
Nitrofurantoina	100	0	0
Teicoplanina	100	0	0
Tigeciclina	100	0	0
Trimetoprim/Sulfametossazolo	68	0	32
Vancomicina	100	0	0

Infine, nella Tabella 5, vengono ad essere riportati i valori di concentrazione minima inibente (MIC), rilevati nei 25 isolati di *E.coli* sottoposti ad antibiogramma. Per ciascun antibiotico è riportato l'intervallo dei valori di MIC minimo e massimo osservati tra gli isolati analizzati.

Tabella 5: Valori di MIC degli antibiotici testati in *Escherichia coli*.

ANTIBIOTICO	MIC min–max (mg/L)
Amikacina	≤1–4
Amoxicillina/ac. clavulanico	≤4–>32
Ampicillina	≤2–>16
Ampicillina/sulbactam	≤2–≤2
Cefalexina	≤4–>32
Cefixime	≤0,25–>2
Cefpodoxime	≤0,25–>4
Ceftazidime	≤0,12–32
Ceftriaxone	≤0,25–>32
Ciprofloxacina	≤0,06–>2
Ertapenem	≤0,12
Fosfomicina	≤16–>128
Gentamicina	≤1–>8
Imipenem	≤1
Levofloxacina	≤0,12–>4
Linezolid	2
Meropenem	≤0,25
Nitrofurantoina	≤16
Teicoplanina	1
Tigeciclina	≤0,12
Trimetoprim/sulfametossazolo	≤20–>160
Vancomicina	2

4.5.2 *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae è stato isolato in 21 campioni su 131 isolati batterici.

Come mostrato nel Grafico 8, la presenza di *S.agalactiae* (n=21), si associa a una flora lattobacillare prevalentemente ridotta. Nella maggior parte dei campioni i lattobacilli risultano in quantità esigua, in particolare 9 campioni nella categoria “alcuni” e 7 campioni nella categoria “rari”. Inoltre, sono stati registrati 3 campioni nella categoria di assenza completa e solo due campioni nella categoria “numerosi”.

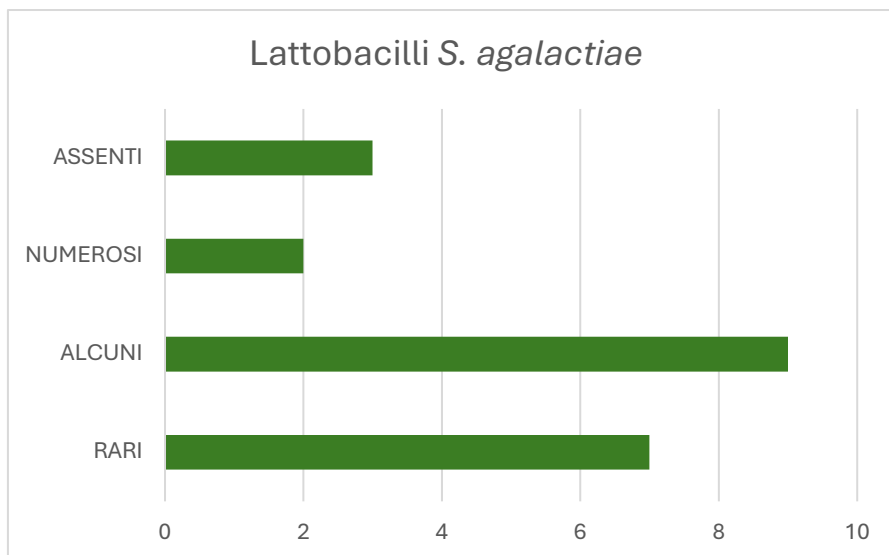


Grafico 8: Conta dei lattobacilli nei campioni positivi per *S. agalactiae*

Per quanto riguarda invece i leucociti, come riportato nel Grafico 9, si osserva che *S. agalactiae* colonizza senza evocare una risposta leucocitaria significativa; infatti, la maggior parte dei campioni è risultata nella categoria “rari” (n=16; 76,2%). Nessun campione è stato associato alla categoria “numerosi”.

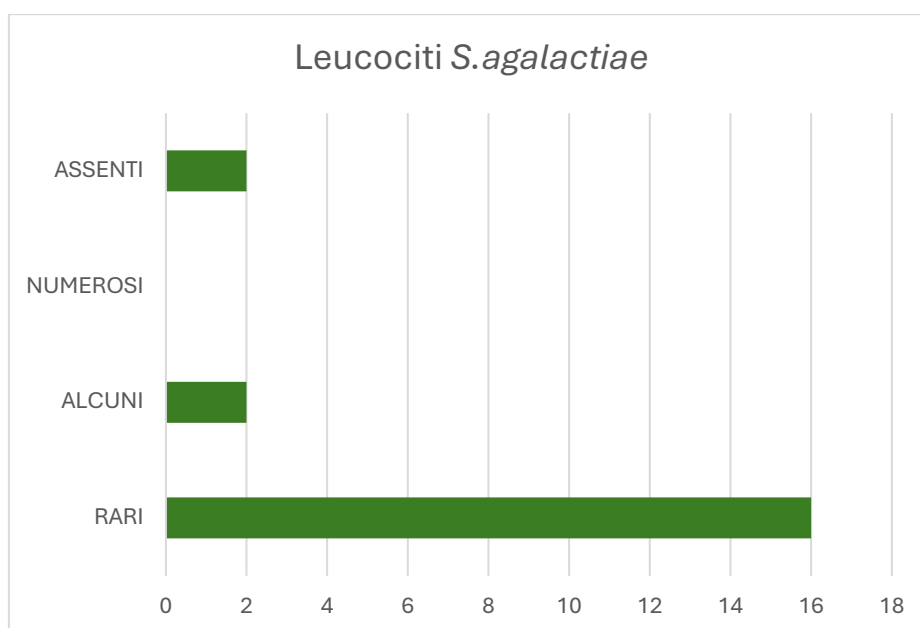


Grafico 9: Conta leucocitaria nei campioni positivi per *S. agalactiae*

Il profilo di sensibilità agli antibiotici per *S. agalactiae* ha evidenziato una sensibilità elevata soprattutto nei confronti di Penicillina G, Teicoplanina e Vancomicina, mentre percentuali maggiori di resistenza sono state osservate per Tetraciclina, Eritromicina e Clindamicina. La Levofloxacin ha invece mostrato un'elevata presenza di risultati intermedi, ovvero di sensibilità ad aumentata esposizione (Tabella 6 e 7).

Tabella 6: Distribuzione del profilo di sensibilità agli antibiotici di *S. agalactiae*

ANTIBIOTICO	S	I	R
Clindamicina	13	0	8
Daptomicina	0	0	1
Eritromicina	9	0	12
Gentamicina-Sin	0	0	1
Levofloxacin	0	20	1
Linezolid	20	0	1
Moxifloxacin	20	0	1
Penicillina G	21	0	0
Rifampicina	11	0	9
Teicoplanina	21	0	0
Tetraciclina	4	0	17
Tigeciclina	19	0	1
Trimetoprim/Sulfametossazolo	20	0	0
Vancomicina	21	0	0

Tabella 7: Percentuale di ceppi Sensibili (S), Intermedi (I) e Resistenti (R) di *S. agalactiae*

ANTIBIOTICO	%S	%I	%R
Clindamicina	61,9	0	38,1
Daptomicina	0	0	100
Eritromicina	42,9	0	57,1
Gentamicina-Sin	0	0	100
Levofloxacin	0	95,2	4,8
Linezolid	95,2	0	4,8
Moxifloxacin	95,2	0	4,8
Penicillina G	100	0	0
Rifampicina	55	0	45
Teicoplanina	100	0	0
Tetraciclina	19	0	81
Tigeciclina	95	0	5
Trimetoprim/Sulfametossazolo	100	0	0
Vancomicina	100	0	0

La Tabella 8 riporta i valori di concentrazione minima inibente (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) rilevati nei 21 isolati di *S.agalactiae* sottoposti ad antibiogramma. Per ciascun antibiotico è riportato l'intervallo dei valori di MIC osservati tra gli isolati analizzati.

Tabella 8: Valori di MIC degli antibiotici testati in *Streptococcus agalactiae*

ANTIBIOTICO	MIC min-max (mg/L)
Clindamicina	≤0,25-→0,5
Daptomicina	>1
Eritromicina	≤0,12-→4
Gentamicina-SIN	>1000
Levofloxacin	0,5-8
Linezolid	≤2-→4
Moxifloxacin	0,03-→2
Penicillina G	≤0,06-0,12
Rifampicina	≤0,06-2
Teicoplanina	≤0,12-≤1
Tetraciclina	≤0,25-→8
Tigeciclina	≤0,06-0,5
Trimetoprim/sulfametossazolo	≤10
Vancomicina	0,25-0,5

4.5.3 *Enterococcus faecalis*

Su un totale di 131 isolati batterici, *Enterococcus faecalis* è stato isolato in 19 casi.

Nei campioni positivi per *Enterococcus faecalis*, la componente lattobacillare ha mostrato una distribuzione variabile. Come evidenziato nel Grafico 10, la categoria “alcuni” è risultata quella maggiormente rappresentata con 9 casi, seguita da “rari” con 6 casi e “numerosi” con 4 casi. Non sono stati osservati campioni privi di lattobacilli e pertanto nessun campione inserito nella categoria “assenti”.

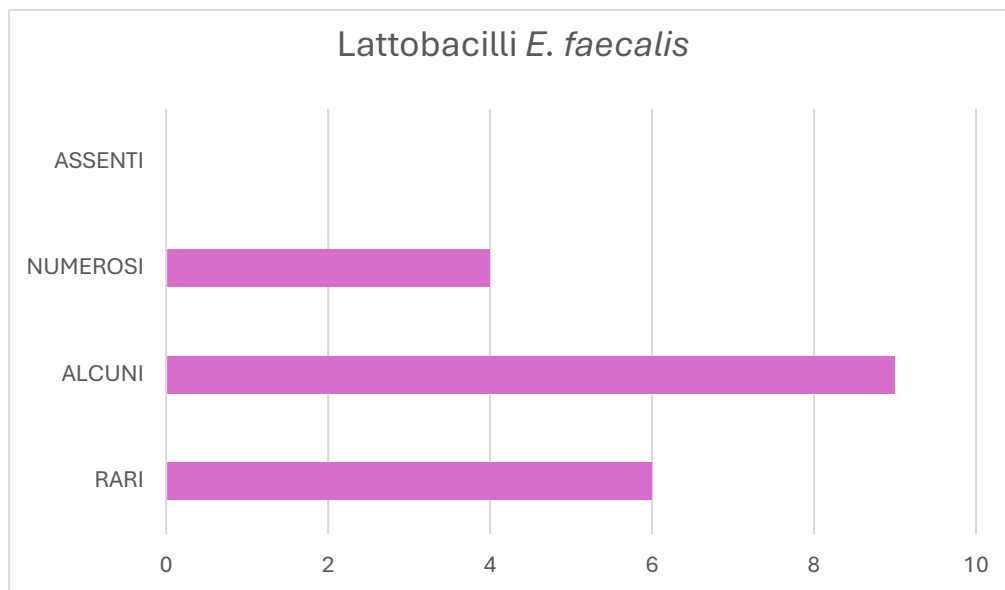


Grafico 10: Conta dei lattobacilli nei campioni positivi per *Enterococcus faecalis*

Dall'analisi della conta leucocitaria (Grafico 11) nei 19 campioni positivi per *E. faecalis*, si osserva che la categoria maggiormente rappresentata è “rari” con 11 casi, seguita da “alcuni” con 6 casi. Le categorie “numerosi” e “assenti”, risultano residuali, con 1 caso ciascuna.

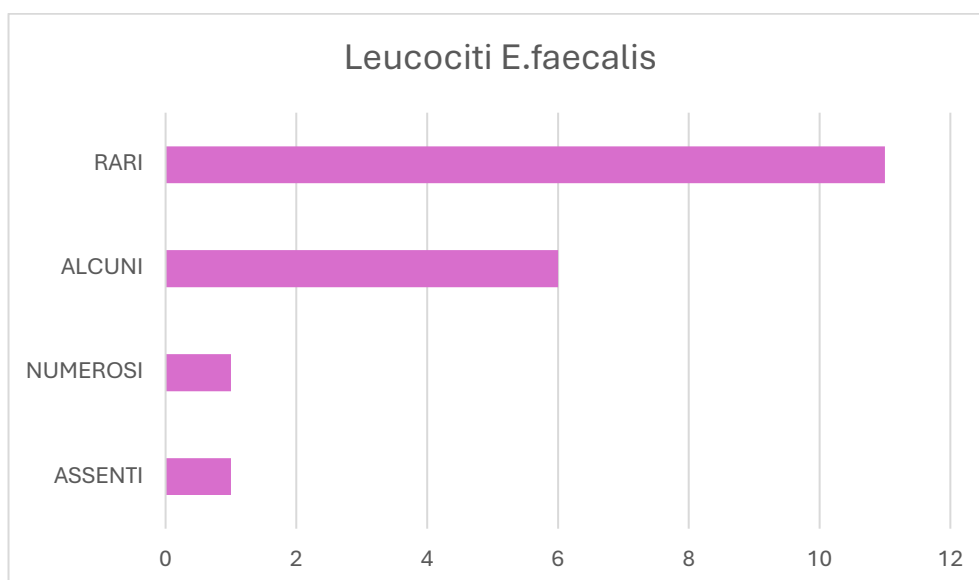


Grafico 11: Conta leucocitaria nei campioni positivi per *Enterococcus faecalis*

Dall'analisi del profilo di sensibilità di *Enterococcus faecalis* (n=19) il pannello di sensibilità non è stato uniforme per tutti gli antibiotici. Il numero di isolati testati è variato da 2 a 14 a seconda della molecola. Tuttavia, nonostante il numero variabile di isolati testati, Nitrofurantoina e Linezolid, insieme a Teicoplanina e Levofloxacin, sono risultati quelli maggiormente sensibili (Tabella 7 e 8)

Tabella 7: Distribuzione del profilo di sensibilità agli antibiotici di *Enterococcus faecalis*

ANTIBIOTICO	S	I	R
Alta resistenza alla Gentamicina	2	0	0
Amoxicillina / Acido Clavulanico	8	0	3
Ampicillina	10	0	1
Ampicillina / Sulbactam	9	0	0
Ciprofloxacina	10	0	0
Imipenem	5	6	0
Kanamicina ad alto dosaggio	9	1	0
Levofloxacina	12	1	0
Linezolid	13	0	1
Nitrofurantoina	14	0	0
Streptomycin ad alto dosaggio	6	1	0
Teicoplanina	12	0	0
Tigeciclina	7	0	0
Vancomicina	9	0	0

Tabella 8: Percentuale di ceppi Sensibili (S), Intermedi (I) e Resistenti (R) di *E. faecalis*

ANTIBIOTICO	% S	% I	%R
Alta resistenza alla Gentamicina	100	0	0
Amoxicillina / Acido Clavulanico	72,7	0	27,3
Ampicillina	90,9	0	9,1
Ampicillina / Sulbactam	100	0	0
Ciprofloxacina	100	0	0
Imipenem	45,5	54,5	0
Kanamicina ad alto dosaggio	90	10	0
Levofloxacina	92,3	7,7	0
Linezolid	92,9	0	7,1
Nitrofurantoina	100	0	0
Streptomycin ad alto dosaggio	85,7	14,3	0
Teicoplanina	100	0	0
Tigeciclina	100	0	0
Vancomicina	100	0	0

Infine, nella Tabella 9 vengono riportati i valori minimi e massimi di MIC registrati per le singole molecole testate nei ceppi isolati.

Tabella 9: Valori di MIC degli antibiotici testati in *E. faecalis*

ANTIBIOTICO	MIC min-max (mg/L)
Alta resistenza alla Gentamicina	$\leq 0,12$ -1
Amoxicillina / Acido Clavulanico	$\leq 0,12$ - ≤ 2
Ampicillina	≤ 2 -16
Ampicillina / Sulbactam	$\leq 0,12$ - ≤ 2
Ciprofloxacina	$\leq 0,12$ - ≤ 2
Imipenem	$\leq 0,12$ - ≤ 2
Kanamicina ad alto dosaggio	$\leq 0,5$ - ≤ 16
Levofloxacina	0,25-1
Linezolid	1- ≤ 16
Nitrofurantoina	$\leq 0,5$ - ≤ 16
Streptomicina ad alto dosaggio	$\leq 0,12$ - ≤ 1
Teicoplanina	0,125- ≤ 2
Tigeciclina	$\leq 0,12$ - $\leq 0,12$
Vancomicina	$\leq 0,5$ -2

4.5.4 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae è stato isolata in 7 campioni su 131 isolati batterici.

L'analisi quantitativa della flora lattobacillare nei campioni positivi per *K. pneumoniae* (n=7) ha evidenziato la presenza di lattobacilli in tutti i campioni esaminati, con una distribuzione prevalentemente caratterizzata da una ridotta carica: “rari” in 3/7 casi e “alcuni” in 3/7 casi. In un solo campione, i lattobacilli sono risultati “numerosi”, mentre non è mai stata osservata la loro assenza completa (Grafico12).

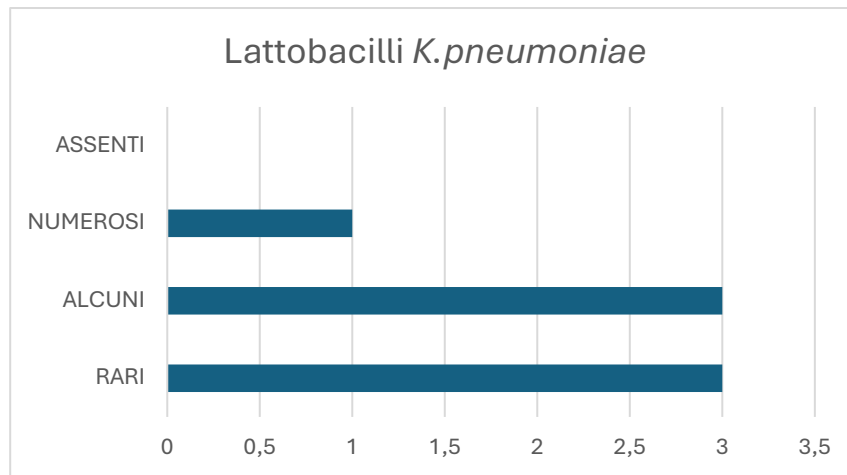


Grafico 12: Conta dei lattobacilli nei campioni positivi per *K. Pneumoniae*

Per quanto riguarda la componente leucocitaria, si è riscontrata una prevalenza di quadri a bassa cellularità: 4 casi con leucociti rari, 2 con assenza e 1 con alcuni elementi. Nessun campione presentava leucociti numerosi (Grafico 13).

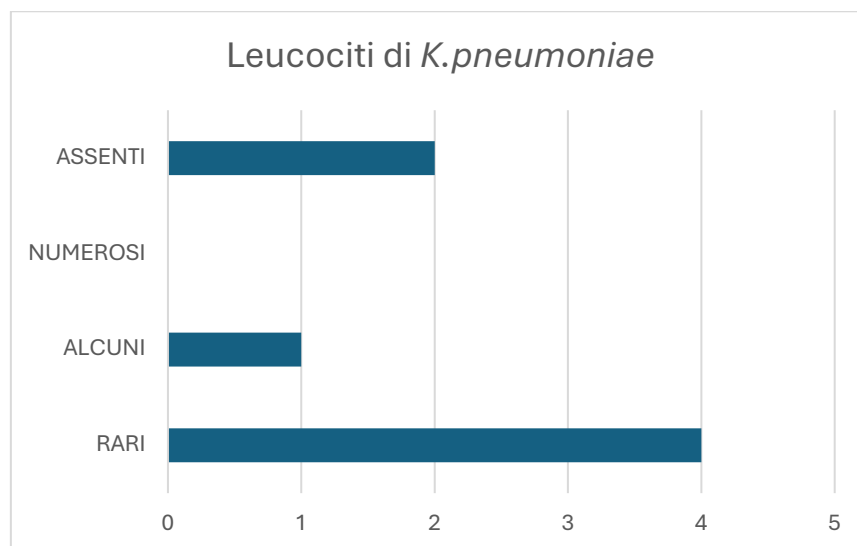


Grafico 13: Conta leucocitaria nei campioni positivi per *K.pneumoniae*

Il profilo di sensibilità ha mostrato una prevalenza di sensibilità agli antibiotici testati, con presenza di resistenze nei confronti di alcuni β -lattamici, Ciprofloxacina, Gentamicina e Trimetoprim/Sulfametossazolo (Tabella 10 e 11).

Tabella 10: Distribuzione del profilo di sensibilità agli antibiotici di *K. pneumoniae*

ANTIBIOTICO	S	I	R
Amikacina	7	0	0
Amoxicillina/Acido clavulanico	6	0	1
Ampicillina	0	0	7
Cefalexina	6	0	1
Cefixime	6	0	1
Cefpodoxime	7	0	0
Ceftazidime	7	0	0
Ceftriaxone	7	0	0
Ciprofloxacina	6	0	1
Ertapenem	7	0	0
Gentamicina	6	0	1
Levofloxacina	6	1	0
Meropenem	7	0	0
Trimetoprim/Sulfametossazolo	6	0	1

Tabella 11: Percentuale di ceppi Sensibili (S), Intermedi (I) e Resistenti (R) di *K. pneumoniae*

ANTIBIOTICO	%S	%I	%R
Amikacina	100	0	0
Amoxicillina/Acido clavulanico	85,7	0	14,3
Ampicillina	0	0	100
Cefalexina	85,7	0	14,3
Cefixime	85,7	0	14,3
Cefpodoxime	100	0	0
Ceftazidime	100	0	0
Ceftriaxone	100	0	0
Ciprofloxacina	85,7	0	14,3
Ertapenem	100	0	0
Gentamicina	85,7	0	14,3
Levofloxacina	85,7	14,3	0
Meropenem	100	0	0
Trimetoprim/Sulfametossazolo	85,7	0	14,3

Tabella 12: Valori di MIC degli antibiotici testati in *K. pneumoniae*

ANTIBIOTICO	MIC min–max (mg/L)
Amikacina	$\leq 1 - \leq 1$
Amoxicillina / Acido Clavulanico	$\leq 4 - > 32$
Ampicillina	$16 - > 16$
Cefalexin	$\leq 4 - > 32$
Cefixime	$\leq 0,25 - > 2$
Cefpodoxime	$\leq 0,25 - \leq 0,25$
Ceftazidime	$\leq 0,12 - 0,25$
Ceftriaxone	$\leq 0,25 - \leq 0,25$
Ciprofloxacina	$\leq 0,06 - 0,5$
Ertapenem	$\leq 0,12 - \leq 0,12$
Gentamicina	$\leq 1 - > 8$
Levofloxacina	$\leq 0,12 - 1$
Meropenem	$\leq 0,25 - \leq 0,25$
Trimetoprim / Sulfametossazolo	$\leq 20 - > 160$

4.5 *Proteus mirabilis*

Su un totale di 131 isolati batterici, *Proteus mirabilis* è stato isolato in 7 casi.

Dall'analisi della conta lattobacillare, come si può osservare nel Grafico 14, nei 7 campioni positivi per *P. mirabilis*, la categoria più rappresentata è risultata “rari” (n=3), seguita da “alcuni” n=2 “assenti” (n=1) e “numerosi” (n=1).

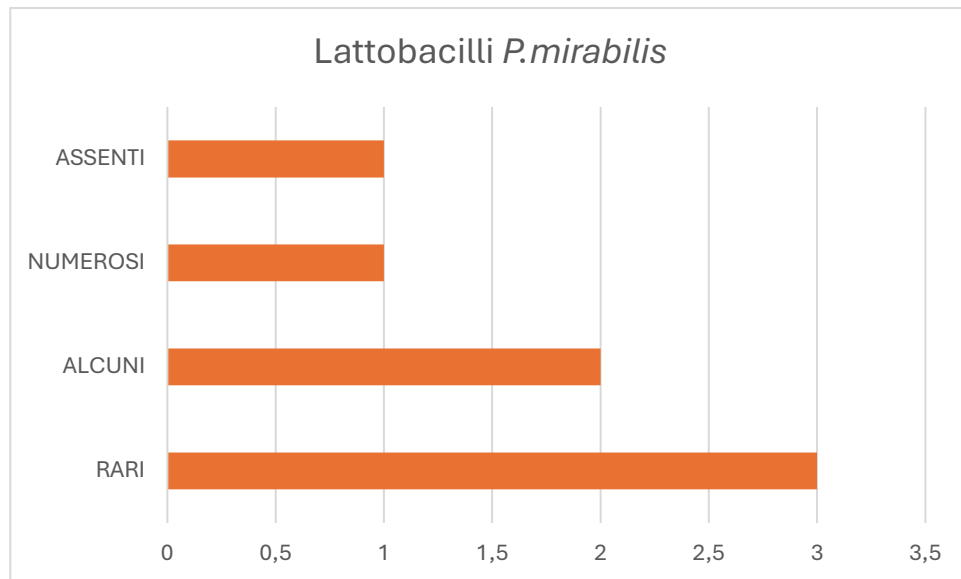


Grafico 14: Conta dei lattobacilli nei campioni positivi di *Proteus mirabilis*

La componente leucocitaria è risultata prevalentemente caratterizzata dalla categoria “rari”, osservata in 6 dei 7 campioni, mentre un solo campione presentava “alcuni” leucociti (Grafico 15).

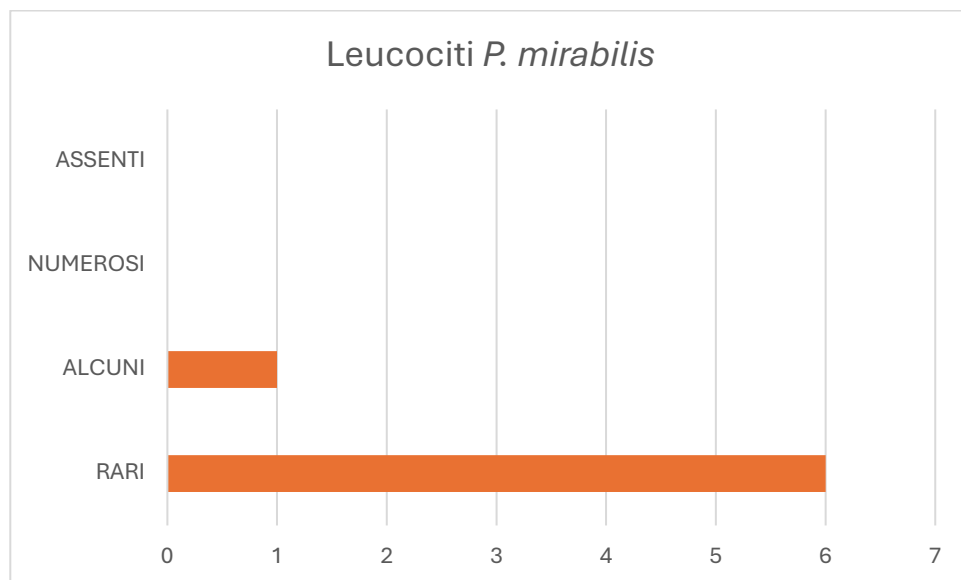


Grafico 15: Conta leucocitaria nei campioni positivi di *P. mirabilis*

Il profilo di sensibilità di *P. mirabilis* (Tabella 13 e 14) ha mostrato un'elevata sensibilità a quasi tutti gli antibiotici testati, ad eccezione di Ampicillina e Trimetoprim/Sulfametossazolo che hanno mostrato 3 ceppi resistenti su 7.

Tabella 13: Distribuzione del profilo di sensibilità agli antibiotici di *P. mirabilis*

ANTIBIOTICO	S	I	R
Amoxicillina/Acido clavulanico	6	0	1
Ampicillina	4	0	3
Cefixime	7	0	0
Cefpodoxime	7	0	0
Ceftazidime	7	0	0
Ceftriaxone	7	0	0
Ciprofloxacina	7	0	0
Ertapenem	7	0	0
Gentamicina	7	0	0
Levofloxacina	7	0	0
Meropenem	7	0	0
Trimetoprim/Sulfametossazolo	4	0	3

Tabella 14: Percentuale di ceppi Sensibili (S), Intermedi (I) e Resistenti (R) di *P. mirabilis*

ANTIBIOTICO	%S	%I	%R
Amoxicillina/Acido clavulanico	85,7	0	14,3
Ampicillina	57,1	0	42,9
Cefixime	100	0	0
Cefpodoxime	100	0	0
Ceftazidime	100	0	0
Ceftriaxone	100	0	0
Ciprofloxacina	100	0	0
Ertapenem	100	0	0
Gentamicina	100	0	0
Levofloxacina	100	0	0
Meropenem	100	0	0
Trimetoprim/Sulfametossazolo	57,1	0	42,9

Infine, come per gli altri ceppi batterici presi in considerazione in questo studio, nella Tabella 15 vengono riportati i valori di MIC, minimo e massimo, registrati per le diverse molecole testate.

Tabella 15: Valori di MIC degli antibiotici testati in *P. mirabilis*

ANTIBIOTICO	MIC min-max (mg/L)
Amoxicillina/Acido clavulanico	<=4-16
Ampicillina	<=2->16
Cefixime	<=0,25-<=0,25
Cefpodoxime	<=0,25-<=0,25
Ceftazidime	<=0,12-<=0,12
Ceftriaxone	<=0,25-<=0,25
Ciprofloxacina	<=0,06-<=0,06
Ertapenem	<=0,12-<=0,12
Gentamicina	<=1-2
Levofloxacina	<=0,12-<=0,12
Meropenem	0,125-<=0,25
Trimetoprim/Sulfametossazolo	<=20->160

4.5.6 Analisi complessiva

A completamento dell'analisi dei singoli patogeni, è stata effettuata una valutazione complessiva delle componenti lattobacillare e leucocitaria in relazione ai cinque batteri presenti in quantità maggiori rispetto agli altri identificati.

Per quanto riguarda la componente lattobacillare, come si può osservare nel Grafico 16, la maggior parte dei campioni sono stati registrati all'interno della categoria “rari” e della categoria “alcuni”. La categoria “assenti” non è stata osservata negli isolati batterici *E. faecalis* e *K. pneumoniae*.

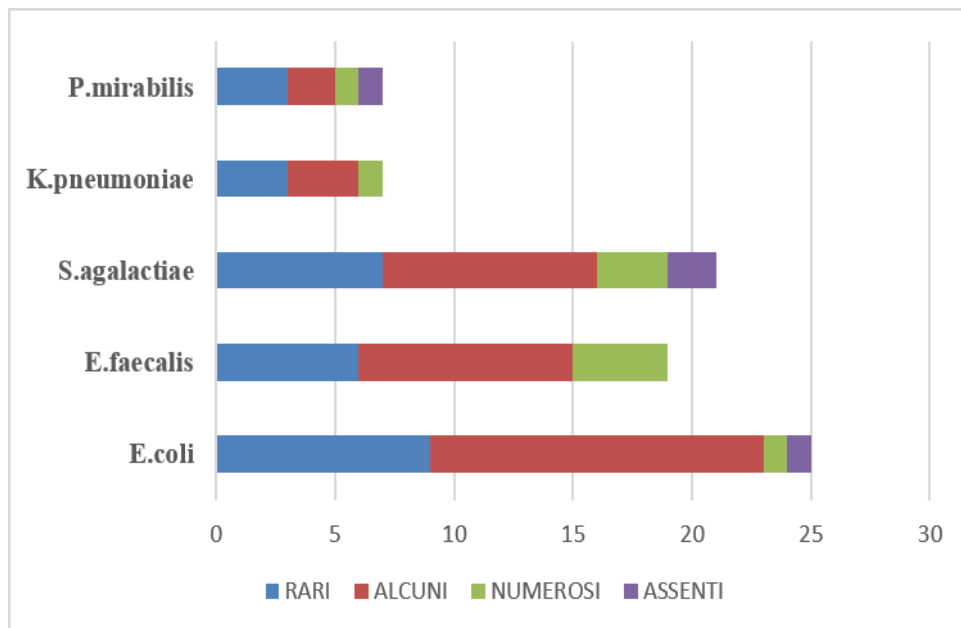


Grafico 16: Conta dei lattobacilli complessiva rilevata nei campioni positivi per i cinque patogeni più frequentemente isolati.

La componente leucocitaria maggiormente risultata, per tutti gli isolati batterici considerati durante l'analisi dello studio, nella categoria “rari”, seguita dalla categoria “alcuni”. Per l'isolato batterico *P. mirabilis* non sono stati osservati campioni nella categoria “numerosi” e “assenti”, mentre per gli isolati di *K. pneumoniae* non sono stati osservati nella categoria “numerosi”, presenti invece negli altri isolati seppur in frequenza minore (Grafico 17).

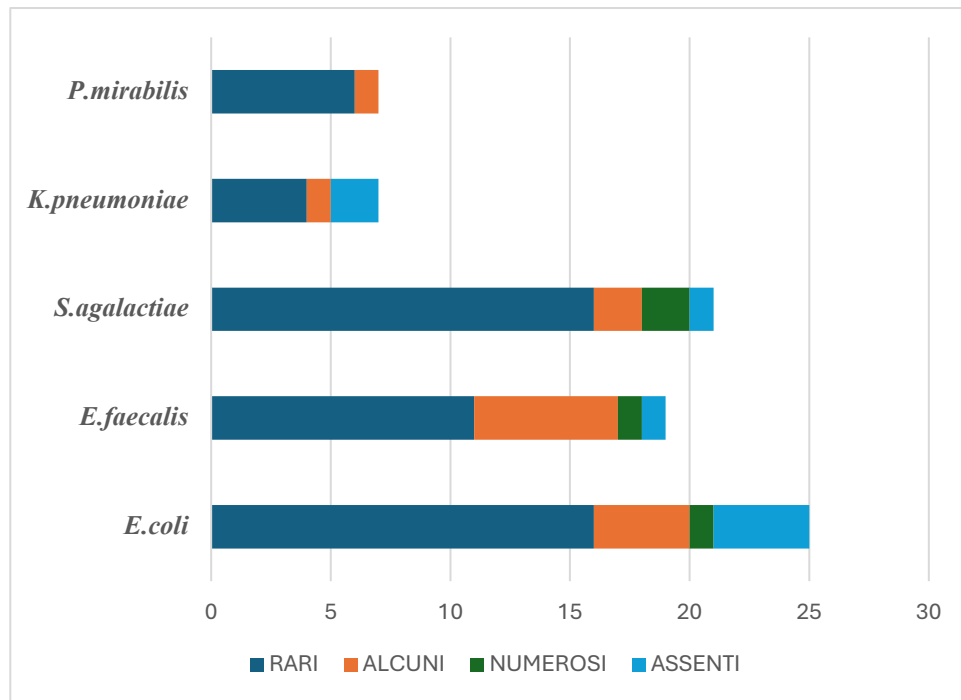


Grafico 17: Conta dei leucociti complessiva rilevata nei campioni positivi per i cinque patogeni più frequentemente isolati.

5. DISCUSSIONE

Nel presente studio sono stati analizzati 510 tamponi cervico-vaginali pervenuti presso il Laboratorio di Microbiologia del Gruppo CIDIMU di Alessandria nel corso dell'anno 2025. L'esame colturale ha evidenziato un esito positivo nel 41,4% dei campioni, mentre il restante 58,6% comprendeva campioni con esito negativo o caratterizzati dalla presenza della flora batterica normalmente residente. Nel complesso, questi risultati evidenziano ali dati confermano come le alterazioni del microbiota vaginale e le infezioni correlate rappresentino una problematica di frequente riscontro nella pratica clinica ginecologica.

L'analisi della distribuzione per fascia d'età ha evidenziato la maggiore frequenza di campioni positivi nelle donne con fascia di età compresa tra i 31 e i 40 anni, che rappresentava il 39,8% di tutti i casi positivi osservati. Tale distribuzione risulta sostanzialmente in accordo con quanto riportato da Church et al. (2025), che in uno studio epidemiologico comprendente 40.259 casi di vaginosi batterica e 32.894 casi di candidosi vulvovaginale, hanno rilevato i più elevati tassi di positività nelle donne di età compresa tra 20 e 34 anni. Gli autori hanno messo in relazione tale distribuzione con caratteristiche fisiologiche proprie dell'età riproduttiva e fertile, condizioni che possono influenzare la composizione del microbiota vaginale e predisporre all'insorgenza di episodi infettivi. I risultati della presente casistica, pur riferendosi a una popolazione e a criteri di classificazione diversi, mostrano pertanto una distribuzione della positività maggiormente concentrata nelle fasce dell'età riproduttiva.

Per quanto riguarda la distribuzione microbiologica, *Gardnerella vaginalis* è risultata la specie maggiormente rappresentata, con 37 isolati pari al 28,2% del totale dei batteri identificati, seguita da *Escherichia coli* (25 isolati; 19,1%), *Streptococcus agalactiae* (21 isolati; 16,0%) ed *Enterococcus faecalis* (19 isolati; 14,5%). La predominanza di *G. vaginalis* risulta coerente con il ruolo maggiormente descritto di questo microrganismo nell'ambito

della vaginosi batterica. In uno studio condotto su 200 donne con secrezioni vaginali, *Gardnerella vaginalis* ha rappresentato il 32% dei patogeni isolati, mentre *Escherichia coli* ha costituito il 18% degli isolati totali (Tabassum et al., 2024). I valori osservati nella presente casistica, rispettivamente 28,2% e 19,1%, risultano pertanto comparabili con quelli riportati nello studio citato, pur considerando le differenze tra le popolazioni esaminate.

La frequente identificazione di *Escherichia coli* trova inoltre riscontro nei dati riportati da Bitew e collaboratori (Bitew et al., 2017), che hanno analizzato 210 donne affette da infezioni del tratto genitale, identificando 151 isolati batterici, dei quali il 69,5% apparteneva a batteri Gram-negativi e il 30,5% a batteri Gram-positivi. Gli autori hanno identificato *E. coli* tra i principali microrganismi isolati. Il riscontro di *E. coli* nel presente studio risulta pertanto coerente con la frequente identificazione di questo microrganismo nelle infezioni del tratto genitale, confermando il ruolo di questo batterio nelle infezioni cervico-vaginali e nelle condizioni di disbiosi.

Anche *Enterococcus faecalis* ha mostrato una frequenza rilevante nella popolazione analizzata, rappresentando il 14,5% degli isolati batterici. Tale dato trova riscontro nella letteratura scientifica. In uno studio condotto su donne in età riproduttiva, Daood et al. (2020), hanno identificato *E. faecalis* nel 57,5% dei campioni caratterizzati da crescita batterica positiva, osservandone una maggiore frequenza di infezione nella fascia di età compresa tra 26 e 35 anni. Sebbene le percentuali non siano direttamente confrontabili per via delle differenti popolazioni e dei differenti parametri considerati, entrambi gli studi evidenziano l'identificazione di *E. faecalis* nei campioni vaginali

Analogamente, Sengupta et al. (2021) hanno isolato 39 ceppi appartenenti al genere *Enterococcus* in campioni di donne con vaginite, dei quali 27 identificati come *Enterococcus faecalis*, evidenziando la frequente di questa specie nei campioni vaginali analizzati.

Un ulteriore elemento di interesse riguarda la componente lattobacillare. Nei campioni positivi per *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* è stata osservata una prevalenza di lattobacilli classificati come "rari" o "alcuni", mentre i campioni caratterizzati dalla presenza di una flora lattobacillare numerosa risultavano meno frequenti. Tale osservazione appare coerente con quanto descritto da Ravel et al. (2011), secondo cui il microbiota vaginale sano è generalmente dominato da specie appartenenti al genere *Lactobacillus*, mentre condizioni di disbiosi sono associate a una riduzione di tali popolazioni e a una maggiore diversità microbica. La perdita della dominanza lattobacillare determina infatti una riduzione della protezione naturale dell'ambiente vaginale e favorisce la colonizzazione da parte di microrganismi opportunisti.

Per quanto riguarda la componente leucocitaria, i cinque microrganismi analizzati hanno mostrato prevalentemente valori contenuti, con una maggiore frequenza delle categorie "rari" e "alcuni". Tale distribuzione evidenzia che la presenza dei microrganismi isolati non si accompagnava necessariamente a una marcata risposta leucocitaria nei campioni analizzati.

Per quanto riguarda il profilo di sensibilità agli antibiotici, nei cinque microrganismi analizzati è stata osservata una prevalenza di ceppi sensibili per la maggior parte delle molecole testate, sebbene con differenze tra le specie. In particolare, negli isolati di *Escherichia coli* è stata rilevata una generale prevalenza di sensibilità, con una maggiore frequenza di resistenza soprattutto nei confronti di Ampicillina e Amoxicillina/acido clavulanico e, in misura minore, di alcune cefalosporine e fluorochinoloni. Per *Streptococcus agalactiae* è stata osservata una marcata sensibilità a Penicillin G, Teicoplanina e Vancomicina, mentre una maggiore resistenza è stata rilevata per Tetraciclina, Eritromicina e Clindamicina; per Levofloxacin è risultata maggiormente rappresentata la categoria intermedia. Nel complesso, i profili di sensibilità sono risultati differenti tra le specie considerate.

L'interpretazione dei dati deve tenere conto della diversa numerosità degli isolati sottoposti ai singoli test, in particolare per *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, entrambi rappresentati da sette isolati.

Nel complesso, i risultati ottenuti confermano il ruolo centrale della disbiosi vaginale nella comparsa delle infezioni cervico-vaginali e sottolineano l'importanza dell'esame colturale quale strumento diagnostico fondamentale per l'identificazione dei microrganismi responsabili. In particolare, la predominanza di *Gardnerella vaginalis*, associata alla frequente presenza di patogeni opportunisti quali *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* e alla concomitante riduzione della componente lattobacillare, risultano globalmente coerenti con quanto riportato in letteratura e confermano l'importanza del mantenimento dell'equilibrio del microbiota vaginale nel preservare la salute dell'apparato genitale femminile.

6.CONCLUSIONI

I dati ottenuti confermano il ruolo dell'equilibrio del microbiota vaginale nel mantenimento della salute dell'apparato genitale femminile e sottolineano l'importanza dell'indagine microbiologica nella valutazione delle alterazioni cervico-vaginali. L'identificazione dei microrganismi presenti, associata alla valutazione della componente lattobacillare e, quando indicato, del relativo profilo di sensibilità agli antimicrobici, rappresenta un valido supporto per una corretta gestione diagnostica e terapeutica.

In conclusione, lo studio microbiologico dei tamponi cervico-vaginali rappresenta un importante strumento per la caratterizzazione delle alterazioni dell'ecosistema vaginale. Una maggiore conoscenza della composizione microbica e dei profili di sensibilità dei microrganismi isolati può contribuire a migliorare l'approccio diagnostico e terapeutico alle infezioni cervico-vaginali, favorendo una gestione sempre più mirata e appropriata delle pazienti.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Anahtar MN, Gootenberg DB, Mitchell CM, Kwon DS (2018) “Cervicovaginal microbiota and reproductive health: the virtue of simplicity”. *Cell Host Microbe*, 23: 159-168.
- 2) Avitabile E, Menotti L, Croatti V, Giordani B, Parolin C, Vitali B (2024) “Protective mechanisms of vaginal lactobacilli against sexually transmitted viral infections” *Int J Mol Sci*, 23;25(17):9168
- 3) Bitew A, Abebaw Y, Bekele D, Mihret A (2017) “Prevalence of Bacterial Vaginosis and Associated Risk Factors among Women Complaining of Genital Tract Infection”. *International Journal of Microbiology*, 2017:4919404.
- 4) Borrego-Ruiz A, Borrego JJ (2025) “Determinants of Vaginal Microbiome Stability and Homeostasis”. *Biocell*, 49,1: 1311-1338.
- 5) Campisciano G, Zanotta N, Petix V, Giangreco M, Ricci G, Maso G, Comar F, De Seta F (2021) “Vaginal dysbiosis and partial bacterial vaginosis: the interpretation of the grey zones of clinical practice” *Diagnostics*, 11(2), 191
- 6) Church D, Naugler C, Guo M and Somayaji R (2025) “Evaluating the epidemiology of vaginitis in a contemporary cohort: a population-based study”. *Front. Public Health*, 12:1486356.
- 7) CDC – Centers for disease control and prevention. (2021) “Bacterial Vaginosis - STI Treatment Guidelines”. U.S. Department of Health and Human Services. CDC STI Guidelines
- 8) Daood II, Shareef ShY, Al Jubory IH, Almukhtar SH (2020) “Evaluation and antimicrobial susceptibility testing of *Enterococcus faecalis* isolated from high vagina”. *Eurasia J Biosci* 14: 1715- 1720.

- 9)
- 10) Dubè-Zinatelli E, Cappelletti L, Ismail N (2025) “The vaginal microbiome in bacterial vaginosis: pathogenesis, reproductive impacts, and emerging therapies”. *Journal of reproductive immunology*, 172, 104804.
- 11) Fong Amaris WM, Assumpção PP, Valadares LJ, Moreira FC (2024) “Microbiota changes: the unseen players in cervical cancer progression”. *Front. Microbiol.*, 15:1352778.
- 12) Garcia-Garrote F, Cercenado E, Bouza E (2000) “Evaluation of a New System, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterococci”. *J Clin Microbiol*, 38(6): 2108-2111.
- 13) Han Y, Liu Z, Chen T (2021) “Role of Vaginal Microbiota Dysbiosis in Gynecological Diseases and the Potential Interventions”. *Front Microbiol*, 18;12:643422.
- 14) Holdcroft AM, Ireland DJ, Payne MS (2023) “The Vaginal Microbiome in Health and Disease-What Role Do Common Intimate Hygiene Practices Play?”. *Microorganisms*. 11(2):298.
- 15) Jonouchi D, Shenoy S, Saintlouis R, Singh A, Kashyap D, Bhargavi C, Mansoor R, Mansoor E, Honnavar P. (2026) “Vaginal microbiome composition in pregnant and non-pregnant women: community structure, population variation, clinical impact, and metagenomics approaches.”
- 16) Kelsey TW, Ginbey E, Chowdhury MM, Bath LE, Anderson RA, Wallace WHB (2016) “A validated normative model for human uterine volume from birth to age 40 years”. *Plos One*, 11(6): e0157375.
- 17) Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R (2021) “The minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance”. *Pathogens*, 4;10(2):165.

- 18) Lacroix G, Gouyer V, Gottrand F, Desseyn JL (2020) “The cervicovaginal mucus barrier” *Int J Mol Sci*, 21:8266
- 19) Maria C, Zahra R, Sara P (2013) “Prevalence of cervical-vaginal infections in the pap-smear samples in Iran”. *Glob J Health Sci.*, 19;6(1):201-6.
- 20) Mashburn J (2012) “Vaginal infection update”. *Journal of Midwifery & Women’s health*, 57(6), 629-634.
- 21) Nieto MR, Rus MJ, Areal-Quecuty V, Lubian-Lopez DM, Simon-Soro A (2026) “Menopausal shift on women’s health and microbial niches” *npj Womens Health*, 3, 3
- 22) O’Hanlon DE, Moench TR, Cone RA (2013) “Vaginal pH and microbicidal Lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota”. *PLoS One*, 8:e80074.
- 23) Oh H, Park SB, Park HJ, Lee ES, Hur J, Choi W, Choi BI (2021) “Ultrasonographic features of uterine cervical lesions”. *Br J Radiol.* 1;94(1121):20201242.
- 24) Payne MS, Ireland DJ, Watts R, Nathan EA, Furfaro LL, Kemp MW, Keelan JA, Newnham JP (2016) “*Ureaplasma parvum* genotype, combined vaginal colonisation with *Candida albicans*, and spontaneous preterm birth in an Australian cohort of pregnant women”. *BMC Pregnancy Childbirth*, 18;16(1):312.
- 25) Quan M (2010) “Vaginitis: Diagnosis and management”. *Postgraduate Medicine*, 122 (6), 117-127
- 26) Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ (2011) “Vaginal microbiome of reproductive-age women”. *Proc Natl Acad Sci* 15;108.
- 27) Ram D, Julakanti P, Atiquzzaman NT, Nagy S, Lin AY, Kesselman MM (2025) “Dietary Influence on Bacterial Vaginosis”. *Cureus*, 29;17(9):e93506
- 28) Saraf VS, Sheikh SA, Ahmad A, Gillevet PM, Bokhari H, Javed S (2021) “Vaginal microbiome; normalcy vs dysbiosis” *Arc. Microbiol*, 203(7): 3792-3802.

- 29) Sengupta, M.; Sarkar, S.; SenGupta, M.; Ghosh, S.; Sarkar, R.; Banerjee, P. Biofilm Producing *Enterococcus* Isolates from Vaginal Microbiota. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1082. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091082>
- 30) Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ, Marrazzo JM, Fredricks DN (2010) “Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis”. *Plos One*, 15;5(4): e10197
- 31) Tabassum S, Shafi P, Khan H, Badar GFN, Israr S, Khattak K (2024) “Prevalence of microorganisms in high vaginal swabs from women presenting with vaginal discharge in outpatient clinics”. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, 31(8), 3371-3378.
- 32) Wang Y, Wang X, Zhu M, Ge L, Liu X, Su K, Chen Z (2022) “The interplay between Cervicovaginal microbial dysbiosis and cervicovaginal immunity”. *Front. Immunol.* 13:857299.
- 33) Yarbrough VL, Winkle S, Herbst-Kralovetz MM (2015) “Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: a critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications” *Hum Reprod Update*, 21: 353-377
- 34) Zhang Y, Wei T, Zhao C, Zhang L (2026) “The Role of the Vaginal Microbiome in Gynecological Diseases: Mechanistic Insights and Emerging Interventions”. *Biology*, 15, 432.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la mia relatrice, la prof.ssa Giorgia Novello, per la guida, la disponibilità e i preziosi consigli. Il suo supporto è stato fondamentale per questo traguardo.

Mamma e papà, per voi non finirei mai di scrivere: mi servirebbe una vita intera, piena di parole, per dirvi tutto quello che penso. Fin dall'adolescenza mi avete sempre lasciata libera di intraprendere la strada che io volessi e che mi facesse stare bene, anche se non è stato affatto facile, né per voi né principalmente per me. Non sono stata la figlia modello, quella che si laurea nei tempi previsti: ho sempre sforato, ho accumulato ritardi, ho collezionato bocciature. Eppure, non me le avete mai fatte pesare, non me le avete mai fatte vivere come un fallimento. Anche quando il mio stare male diventava anche il vostro, mi avete sempre mostrato la luce invece del buio, dicendomi che la prossima volta sarebbe andata meglio, che studiando con più calma quella conoscenza mi sarebbe comunque servita, magari per un concorso. Non avete mai pensato che quegli insuccessi fossero dovuti a mancanza di impegno, e questa fiducia, mantenuta anche a distanza, per me ha significato tutto. Il vostro esempio non ha influenzato soltanto il mio percorso accademico, ma anche la mia persona. Da voi ho imparato a non arrendermi di fronte alle mille difficoltà di varia natura che la vita ti presenta, a trovare sempre una soluzione senza rimanere bloccata, a trovare un equilibrio tra vita e studio pur portando sempre a termine gli impegni, a essere determinata e a capire come gira il mondo, perché le cose, nella vita, bisogna andarsele a prendere e non aspettare che arrivino. Vi ringrazio per i mille sacrifici fatti in questi anni, per esservi privati di tanto pur di non far mancare nulla a me. Spero che questo traguardo

vi abbia resi, almeno un po', fieri di me, e che ogni traguardo che raggiungerò da qui in avanti sia anche un po' vostro. Siete, e sarete sempre, la mia fonte di ispirazione, e spero che un domani io riesca, almeno un po', a essere come voi e a fare ciò che voi avete sempre fatto per me.

Ad Ilaria, grazie per tutti questi anni condivisi insieme, per le mille risate e i mille pianti, per tutte le volte in cui siamo state l'una la spalla dell'altra e per aver condiviso con me così tanti momenti importanti. Grazie per essere stata una presenza costante nella mia vita, per avermi ascoltata, capita e sostenuta, anche quando magari non era facile farlo. Grazie per tutte le volte in cui, prima di entrare in aula per ogni esame, riuscivi a tranquillizzarmi e a farmi sentire più sicura, anche quando tu per prima non eri serena. E poi Casa Sappa, che racchiude una parte enorme dei nostri ricordi: le serate, le risate, le chiacchiere e tutte quelle giornate che, mentre le vivevamo, erano semplicemente la nostra quotidianità e che oggi custodisco con tanto affetto.

A Graziella, grazie per essere sempre stata quella presenza solare, pazza e affettuosa, capace di portare un po' di allegria anche quando le giornate non giravano per il verso giusto. Grazie per le risate, per la tua spontaneità, per il modo tutto tuo di dimostrare affetto e per tutte le volte in cui, anche senza saperlo, sei riuscita a rendere più leggeri i momenti difficili. Sono felice di averti incontrata in questi due anni e di aver condiviso con te così tanti momenti.

A tutti i ragazzi e le ragazze di Casa Sappa. Grazie a voi, perché anche i momenti più difficili riuscivano a diventare semplicemente più leggeri. Tra i mille caffè presi la mattina, i pranzi e le cene insieme, le chiacchiere, le risate e le serate passate a fare tardi, avete trasformato una casa in un posto in cui sentirmi sempre a casa. Grazie per esserci stati nei giorni belli e soprattutto in quelli più pesanti, per avermi regalato momenti di leggerezza quando ne avevo più bisogno e per aver condiviso con me una parte così importante di questi anni. Porterò sempre con me tutto quello che abbiamo vissuto insieme e, soprattutto, la fortuna di aver trovato in voi una seconda famiglia.

-A nonna Franca, l'unica nonna che ho ancora la fortuna di avere accanto. Grazie per esserci sempre stata, per il tuo amore, per tutte quelle piccole attenzioni che, nel tempo, mi hanno fatto sentire sempre amata e protetta. Oggi che raggiungo questo traguardo, sono felice di poterlo condividere con te e di poterti vedere sorridere per me.

Ringrazio gli amici di Torino, Justine, Francesco, Caterina, Davide, Giuseppe, Alessandra, Gianmarco e Rebecca, che di torinese hanno ben poco. Ci conosciamo da poco, ma sono felice di avervi conosciuti e di condividere con voi questo giorno.

A nonna Rosalia, nonno Rocco e zio Andrea, che oggi non sono qui con me, ma che sono certa mi hanno accompagnata, in qualche modo, dall'inizio alla fine di questo percorso. Oggi vi porto con me in questo traguardo, come vi ho portati con me lungo tutta questa strada. Questa laurea è anche per voi. Spero che, ovunque siate, possiate essere fieri di me.

Infine, ringrazio tutti voi presenti: i miei cognati Simone, Cristian, Elisabetta e Stefania, i miei nipotini, i miei suoceri, i miei cugini, i miei zii, i miei amici, Gaspare, Stefania e Michele. Grazie a tutti voi per aver fatto tanta strada e per aver trovato il modo di essere qui oggi, insieme a me, a festeggiare il traguardo che ho tanto atteso e desiderato.