



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

CARATTERIZZAZIONE DEL MICROBIOMA VAGINALE E PERIVESTIBOLARE
IN PAZIENTI CON DOLORE VULVARE PERSISTENTE.
STUDIO OSSERVAZIONALE CASO-CONTROLLO

Tesi di:

Camilla Caimi

Matricola: 814658

Relatore: **Chiar.ma Prof.ssa Irene CETIN**

Correlatore: **Dott. Filippo MURINA**

Anno Accademico 2018/2019

Sommario

1. INTRODUZIONE	3
1.1 <i>IL DOLORE VULVARE: DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA</i>	3
1.2 <i>ANATOMIA DELLA REGIONE VULVARE</i>	5
1.3 <i>EZIOPATOGENESI DELLA VULVODINIA.....</i>	6
1.4 <i>DIAGNOSI DI VULVODINIA.....</i>	11
1.5 <i>TRATTAMENTO DELLA VULVODINIA</i>	13
BIBLIOGRAFIA	14
2. OBIETTIVI DELLO STUDIO	17
3. MATERIALI E METODI	18
4. RISULTATI.....	21
5. DISCUSSIONE	31
6. CONCLUSIONI	37
BIBLIOGRAFIA	35
7. BIBLIOGRAFIA.....	38

1 INTRODUZIONE

1.1 Il Dolore vulvare: definizione ed epidemiologia

L'International Society for the Study of Vulvovaginal Disease (ISSVD) del 2015 ha classificato il dolore cronico vulvare in due principali gruppi: il dolore derivato da una chiara e identificabile causa (infezione, infiammazione, neoplasia, trauma, patologia neurologica) e la vulvodinia.¹ La vulvodinia è definita come una condizione associata a bruciore, dolore e/o dispareunia priva di alterazioni visibili o di disturbi neurologici specifici clinicamente identificabili, della durata di almeno tre mesi (Tab1).²

Tabella 1 Classificazione del dolore vulvare

<p>A. Dolore vulvare correlato ad una causa identificabile</p> <ol style="list-style-type: none">1. Infezioni (es, candidiasis, herpes, etc)2. Infiammazioni (es, lichen planus, lichen sclerosus, etc)3. Neoplasie (es, VIN, carcinoma, etc)4. Neurologiche (es, neuropatia post-herpetica,nevralgia del pudendo, etc) <p>B. Vulvodinia</p> <ol style="list-style-type: none">1. Generalizzata<ol style="list-style-type: none">a. Provocatab. Non provocatac. Mista2. Localizzata (vestibulodinia, clitorodinia, etc)<ol style="list-style-type: none">a. Provocatab. Non provocatac. Mista

Il campo del dolore vulvare è pervaso da una drammatica confusione nosografica e diagnostica dovuta al fatto che spesso si pensa sia solo un'invenzione psicogena o un sintomo misterioso che viene incluso sotto la dicitura di "vulvodinia/vestibolodinia".

Le caratteristiche del dolore vulvare possono essere suddivise in tre principali categorie³:

- Dolore vulvare acuto, di tipo nocicettivo, con le seguenti particolarità:

¹ (Goldstein AT 2016)

² (Henzell H 2017)

³ (Murina, Vulvar Pain 2017)

- Un'inflammation localizzata alla vulva
- Tendente alla risoluzione
- Durata minore di tre mesi
- Variabile intensità
- Dolore vulvare cronico quando l'inflammation tende a:
 - Coinvolgere progressivamente gli organi vicini
 - Non risolversi e andare in contro ad un peggioramento
 - Durare più di tre/sei mesi
 - Avere un'intensità inappropriata rispetto al danno
 - Coinvolgere il sistema nervoso centrale con neuroinflammation che coinvolge neuroni e microglia
- Dolore vulvare neuropatico quando il dolore diviene malattia a sé stante. Si parla di dolore neuropatico quando è presente una sensazione dolorosa cronica che compare a seguito di un deterioramento, o di un malfunzionamento, dei nervi del sistema nervoso periferico (neuropatia periferica) o delle strutture del sistema nervoso centrale.

Nell' 80% circa delle pazienti il vestibolo vaginale è la sede dove si concentra la triade fondamentale dei disturbi di bruciore, dolore e dispareunia, definendo la condizione come vestibolodinia.

La vulvodinia localizzata, anche se raramente, può essere evidenziata in altre regioni vulvari, come il clitoride (clitorodinia). Il dolore può colpire anche gran parte della regione vulvare (vulvodinia generalizzata), con possibile estensione anche alla regione perianale.

Ulteriore elemento di classificazione è in base allo stimolo: se i disturbi sono evocati da stimolazione, contatto, sfregamento e penetrazione vaginale, si parlerà di vestibolodinia provocata.

Quando i sintomi compaiono senza stimolo scatenante si parla di vestibolodinia spontanea.

La vulvodinia è una condizione patologica frequente che colpisce donne di tutte le età, con una prevalenza stimata del 10-28%⁴, superiore nelle giovani donne e con un secondo picco in donne in menopausa⁵. La vestibolodinia è frequente soprattutto nelle giovani donne, mentre quella generalizzata si presenta maggiormente durante la post-menopausa.

L'incidenza del dolore vulvare è aumentata negli ultimi tre decenni e la ragione è duplice: in primo luogo, c'è una maggiore consapevolezza del dolore vulvare, che viene sempre più segnalato agli

⁴ (Graziottin e Murina 2017)

⁵ (Vieira-Baptista P 2018)

operatori sanitari e, in secondo luogo, c'è un reale aumento dei fattori eziopatogenetici. Diversi studi dimostrano che solo il 60% delle pazienti con dolore vulvare cronico cercano assistenza medica⁶, soprattutto perché si sentono giudicate per la loro condizione; inoltre, la mancanza di conoscenza di questa patologia da parte degli operatori sanitari si ripercuote sulle diagnosi: solo una piccola parte delle pazienti che soddisfano i criteri della vulvodinia riceve una diagnosi e un trattamento appropriato. In uno studio epidemiologico del 2012 solo l'1,4% delle vestibolodinia erano state correttamente diagnosticate.⁷

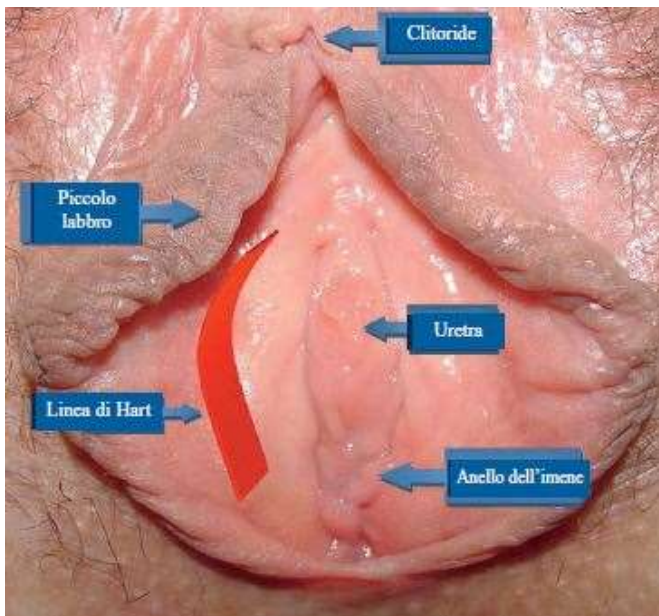
1.2 Anatomia della regione vulvare

Per comprendere meglio le caratteristiche e l'insorgenza di questa malattia, è opportuno descrivere brevemente alcune caratteristiche della regione vulvare.

La vulva ha diversi tipi di epitelio: la parte laterale delle grandi labbra è coperta di epitelio cheratinizzato con follicoli piliferi, mentre la porzione mediale delle grandi labbra e delle piccole labbra è rivestita di epitelio mucoso modificato parzialmente cheratinizzato, che contiene follicoli piliferi sottili, ghiandole sudoripare apocrine e ghiandole sebacee. Sulla faccia mediale delle piccole labbra, la linea di Hart segna il confine tra l'epitelio modificato (di origine ectodermica) e l'epitelio vestibolare (di origine endodermica). Il vestibolo vulvare ha caratteristiche anatomiche che lo rendono peculiare rispetto ad altre regioni dell'apparato genitale inferiore: l'epitelio non cheratinizzato contiene un'alta concentrazione di terminazioni nervose sensitive che raggiungono gli strati più superficiali del rivestimento ed ha anche un'alta concentrazione di recettori estrogenici e androgenici (soprattutto adiacenti agli elementi ghiandolari). Inoltre, bisogna ricordare che la vulva è particolarmente esposta a numerose infezioni, stimoli traumatici e allergici, che la rendono altamente

⁶ (Nguyen RH 2013)

⁷ (H. S. Reed BD 2012)



1-1 La vulva (modificato da "Manuale di colposcopia e patologia del tratto genitale inferiore"; F. Murina-2018)

vulnerabile allo sviluppo di modificazioni nocicettive tipiche della vestibolodinia.⁸ Un'altra parte della regione vulvare è quella clitoridea. Il clitoride è una struttura caratterizzata da un tessuto erettile ad alta componente neurovascolare. Il corpo clitorideo è composto da due corpi cavernosi, che all'apice formano il glande clitorideo, parzialmente coperto da pieghe che si estendono dalle piccole labbra (cappello clitorideo).

La cute vulvare, come quella di altri distretti corporei, ha un film idrolipidico superficiale,

che riveste primariamente funzioni protettive. Fattori locali come il calore, l'umidità e l'attrito indeboliscono la funzione della barriera cutanea vulvare, contribuendo all'irritazione. Il film idrolipidico è ulteriormente danneggiato dalla maggior parte delle malattie vulvari e il suo ripristino è un elemento essenziale dei protocolli di trattamento.⁹

1.3 Eziopatogenesi della vulvodinia

L'eziopatogenesi della vulvodinia non è completamente conosciuta, ma si pensa che abbia un'origine multifattoriale. Numerose evidenze correlano l'insorgenza della malattia a fattori innescanti che sommandosi sono in grado di modificare le terminazioni nervose vestibolari, innescando un'alterazione della percezione nocicettiva periferica e centrale che tende ad auto mantenersi.

Gli elementi trigger possono essere elementi allergici, microtraumatici, infiammatori ed in particolare infettivi. I fattori scatenanti probabili sono: meccanismi centrali neurologici, infiammazione, proliferazione neurale, alterazioni del pattern muscoloscheletrico (es. iperattività dei muscoli pelvici,

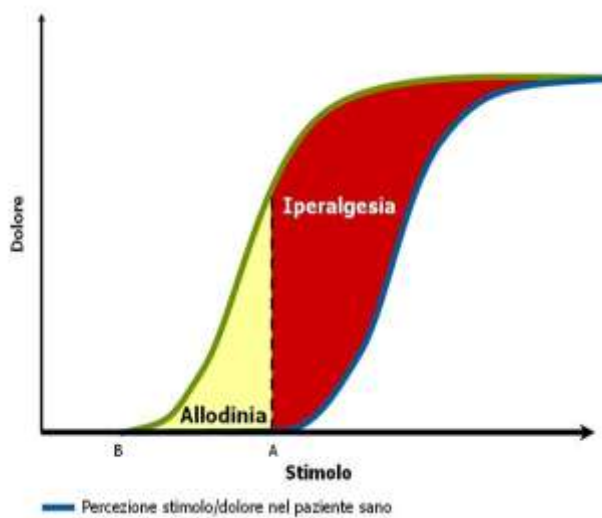
⁸ (H. S. Reed BD 2012)

⁹ (Murina, Manuale di colposcopia e patologia del tratto genitale inferiore s.d.)

disturbi miofasciali, fattori biomeccanici), predisposizione genetica, fattori ormonali, fattori psicosociali (es. umore, interpersonali, coping, funzione sessuale).

La candidosi è una delle più importanti infezioni correlata all'insorgenza della vestibolodinia e del dolore vulvare, infatti oltre 50% delle pazienti con vulvodinia ha un'anamnesi di candidosi ricorrente prima dell'insorgenza della malattia. Una storia di vaginosi batterica, tricomoniasi ed infezioni del tratto urinario sono state tutte associate ad un maggiore rischio di vestibolodinia, dove la ricorrenza è sicuramente elemento rilevante. Si ipotizza che durante o dopo un insulto vulvo-vaginale iniziale, un soggetto suscettibile presenti una risposta infiammatoria importante e persistente, caratterizzata dal rilascio di citochine proinfiammatorie, neurochine e/o chemochine. Il processo neuroinfiammatorio non viene limitato ma tende ad amplificarsi, alterando e sensibilizzando le fibre nervose vestibolari, con il successivo sviluppo di allodinia ed iperalgesia.

Allodinia ed iperalgesia



Allodinia: risposta dolorosa a uno stimolo che normalmente non è doloroso

Iperalgesia: aumentata risposta a uno stimolo che già di per sé è doloroso

1-2 Immagine tratta da "slideplayer.it"

La candidosi vulvovaginale è tra le infezioni quella che ha una maggior rilevanza nelle genesi della vestibolodinia e del dolore vulvare. Interessanti studi sperimentali hanno dimostrato come il dolore vulvare conseguente ad un'alterazione delle terminazioni nervose vestibolari è preceduto da un'esposizione prolungata o ripetuta del micete, inoltre il prelievo bioptico selettivo di fibroblasti in aree vestibolari dolorose rispetto a zone vulvari adiacenti non iperalgiche, evidenzia un incremento di citochine infiammatorie dopo esposizione ad estratti micotici. Si è osservato che queste pazienti presentano una ridotta capacità nel controllare l'azione della *Candida albicans*, dovuta a un

polimorfismo nel gene che codifica la mannose-binding lectine (MBL), una proteina antimicrobica prodotta dal sistema immunitario.^{10 11 12}

Ulteriori ricerche si sono focalizzate sulla patogenesi infiammatoria della vestibolodinia.

È stata dimostrata un'aumentata densità linfocitaria, in particolare cellule T CD4-positivo, in biopsie vestibolari di donne con vestibolodinia. Inoltre, tessuto linfoide organizzato sottomucosa in sede vestibolare, caratterizzato da un centro terminale con linfociti B e cellule IgA-plasma mucosali mature, è stato evidenziato in donne con vestibolodinia rispetto ai controlli.¹³

È stato ampiamente studiato il ruolo dei mastociti e dei mediatori da questi rilasciati, in relazione alla proliferazione e superficializzazione delle fibre nervose vestibolari. In assenza di un'infiammazione clinicamente visibile, nelle pazienti con vulvodinia è stato riscontrato un numero maggiore di mastociti rispetto ai controlli. È stato dimostrato inoltre che due mediatori proinfiammatori rilasciati dai mastociti, il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) e il fattore di crescita nervosa (NGF), stimolano la proliferazione nervosa che porta all'iperinnervazione¹⁴

Riassumendo, studi recenti hanno rivisitato le potenziali origini della patologia suggerendo che la neuroinfiammazione è elemento rilevante nella genesi del dolore vestibolare.

Esiste un collegamento evidente tra il dolore e l'infiammazione: i mediatori infiammatori e proinfiammatori sono stati a lungo associati all'allodinia.

Questa è generalmente indistinguibile dalla sensibilizzazione al dolore neurale ed è spesso stimolata dal rilascio di fattori intradermici o sottocutanei proinfiammatori, tra cui IL-6 e prostaglandina E2 (PGE2). Tali fattori sono spesso elevati in condizioni di dolore cronico e l'elevata espressione di PGE2 e IL-6 provoca allodinia sia negli studi sull'uomo che sugli animali, mentre la soppressione di questi mediatori proinfiammatori allevia l'allodinia.¹⁵

È stato dimostrato, inoltre, che i fibroblasti umani isolati da siti vulvari dolorosi producono livelli elevati di IL-6 e PGE2 rispetto ai fibroblasti isolati da siti non dolorosi. Inoltre, la produzione del mediatore proinfiammatorio è più elevata in fibroblasti isolati da donne con vestibolodinia a quelli isolati da controlli sani.

¹⁰ (Farmer MA 2011)

¹¹ (Foster D 2015)

¹² (Graziottin e Murina 2017)

¹³ (ML Falsetta 2016)

¹⁴ (ML Falsetta 2016)

¹⁵ (ML Falsetta 2016)

Nelle donne con vestibolodinia, si osservano i seguenti elementi:

- una proliferazione vestibolare di fibre del dolore (nocicettori o recettori C-afferenti, con un aumento fino ai dieci volte superiore alla normale densità delle terminazioni nervose)
- un aumento significativo di mastociti;
- un aumento significativo di mastociti attivati, ossia degranulati, in grado di liberare le diverse molecole infiammatorie nel tessuto circostante (verificata misurandone i livelli di degranulazione).

In particolare, può esserci un'importante correlazione tra l'iperinnervazione e la risposta infiammatoria: le fibre nervose esprimono recettori per riconoscere gli stimoli infiammatori e produrre mediatori proinfiammatori, contemporaneamente gli stimoli infiammatori possono promuovere la proliferazione nervosa (dimostrata in un modello murino di vulvodinia), e l'aumento della densità nervosa può esacerbare la risposta infiammatoria.¹⁶

Numerosi studi, inoltre, hanno mostrato un'alterazione delle fibre nervose vestibolari, caratterizzate da un assottigliamento e una superficializzazione che portano allo sviluppo di due processi sensitivi anormali: iperalgesia ed allodinia.¹⁷

È probabile che l'epitelio vestibolare esprima una risposta anormale ad alcuni eventi infiammatori come infezioni, microtraumi ed esposizione prolungata a sostanze irritanti o allergeni, con conseguente aumento del numero di mastociti attivati. Questa attivazione è associata al rilascio di vari tipi di mediatori, come NGF, triptasi e bradichinina. I mediatori secreti dal mastocita sensibilizzano le fibre nervose nocicettive e inducono la loro proliferazione (sensibilizzazione periferica). L'alterazione delle fibre nervose è in grado di indurre scariche spontanee nelle strutture midollari neuronali, amplificando il processo nocicettivo anormale. La sensibilizzazione nervosa, sia a livello periferico (aumento delle terminazioni nervose, ipereccitabilità e ridotta soglia di attivazione delle terminazioni nervose) che centrale (ipereccitabilità e aumento della trasmissione sinaptica a livello midollare), porta ad una soglia inferiore di attivazione delle fibre nervose stesse, con conseguente allodinia e iperalgesia. La stimolazione cronica induce anche cambiamenti fisiopatologici nel midollo spinale con conseguente scarica continua in grado di causare dolore persistente, sproporzionato rispetto lo stimolo.¹⁸

¹⁶ (ML Falsetta 2016)

¹⁷ (ML Falsetta 2016)

¹⁸ (Latremoliere A 2009)

Inoltre, le pazienti con vestibolodinia mostrano spesso una situazione di ipercontrattilità della muscolatura del pavimento pelvico (ipertono). In condizioni infiammatorie, i riflessi viscerale-somatici attivano i nocicettori, contribuendo allo spasmo muscolare. Il dolore vulvare cronico può portare all'iperattività dei muscoli del pavimento pelvico: l'ipertono dei muscoli superficiali con inserimento nel vestibolo (pubococcigeo, puborettale, puborettale, trasversale superficiale) determina l'allodinia, mentre l'ipertono dei muscoli profondi (iliococcigeo, otturatore interno) determina la dispareunia profonda.¹⁹ Questa condizione porta ad una riduzione della perfusione tissutale, all'accorciamento dei sarcomeri e delle fibre del tessuto connettivo e allo sviluppo di punti miofasciali dolorosi: la pressione sul trigger-point miofasciale porta a dolore localizzato e/o irradiato, mentre l'alterazione neurodinamica e l'ipossia tissutale porta a prurito, bruciore, formicolio o dolore acuto.²⁰ Un ampio spettro di condizioni, che possono essere associate alla vulvodinia (svuotamento alterato della vescica, dolore neuropatico, abuso sessuale, condizioni infiammatorie come endometriosi, cistite interstiziale, sindrome dell'intestino irritabile) possono essere coinvolte nello sviluppo dell'ipertono muscolare.²¹

¹⁹ (King M 2015)

²⁰ (FitzGerald e Kotarinos 2003)

²¹ (FitzGerald MP 2012)

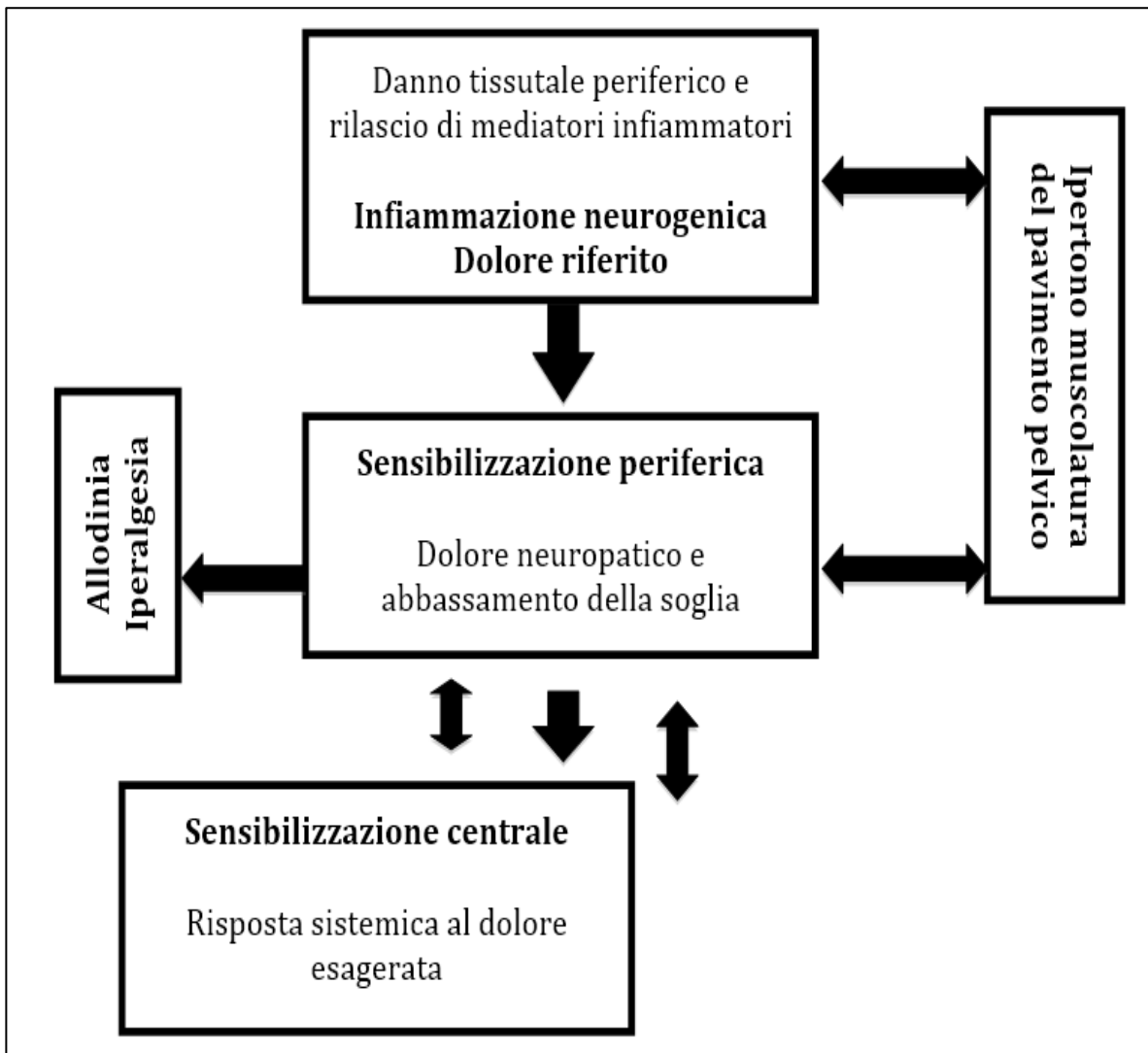


Figura 1-3 **Sintesi della Patogenesi della vulvodinia.** Le modificazioni patologiche implicate nello sviluppo della vulvodinia avvengono a livello di tre sistemi interdipendenti: mucosa vestibolare, muscolatura del pavimento pelvico e sistema nervoso centrale (modificato da [van Lankveld JJ](#) et al, *Women's sexual pain disorders. J Sex Med.* 2010).

1.4 Diagnosi di vulvodinia

In donne con dolore vulvare è fondamentale procedere ad un'attenta valutazione clinico-anamnestica. La storia medica di una paziente fornisce informazioni essenziali per determinare la corretta diagnosi di vulvodinia. È importante porre domande specifiche, per ricevere informazioni dettagliate. È ugualmente essenziale formulare domande a risposta aperta che consentano alla paziente di descrivere con esattezza la sua condizione. Lungo l'intero processo, è essenziale mostrare empatia, comprensione ed apertura.

Storia personale della paziente con vulvodinia: punti essenziali

- Sintomi correnti
- Abitudini personali (igiene, alimentazione, vestiario, abitudini voluttuarie, alcool, fumo, droghe, ecc.)
- Storia pregressa a livello medico e chirurgico, con particolare attenzione alle comorbilità vescicali, intestinali, pelviche e sessuali, e ai fattori iatrogeni
- Storia ginecologica e ostetrica (mestruazioni, contraccezione, pregresse infezioni vulvari, malattie sessualmente trasmesse, ecc.)
- Terapie e allergie
- Storia sessuale (inclusi eventuali abusi) e profilo psicologico
- Funzione vescicale e intestinale

*Modificato da Vulvodinia. A. Graziottin, F.Murina- Springer-Verlag Italia 2011

Durante una visita ginecologica, l'ispezione della regione vulvare rappresenta il primo passo importante nella valutazione della vulva, del perineo e della regione perianale. La vulvosopia permette di valutare in modo molto dettagliato la natura di possibili lesioni vulvari²², quali cambiamenti di colore associati a infiammazioni o malattie neoplastiche della vulva, abrasioni e alterazioni morfologiche. La presenza di eritema, sebbene comune, non è più considerata un criterio diagnostico. In un numero significativo di pazienti si riscontrano segni di atrofia vestibolare con una mucosa sottile, secca, fragile e pallida, simili a quelli che colpiscono le donne in menopausa. Spesso i muscoli del pavimento pelvico sono contratti e dolenti alla palpazione. La valutazione clinica del pavimento pelvico inizia con la semplice osservazione del perineo: in condizioni di riposo, l'estensione dell'ipertono è suggerita dal grado di retrazione del centro tendineo del perineo e viene valutata misurando la distanza tra la commessura vulvare posteriore e l'ano (convenzionalmente è tale se tale distanza è inferiore a tre centimetri). L'invito a contrarre e rilassare il muscolo permette di valutare il tono perineale in condizione dinamica.

²² (Sideri M. 2009)

Il "cotton swab test" è il test standard per la diagnosi di vulvodinia provocata: consiste nella palpazione di diverse regioni genitali, in particolare del vestibolo vulvare, con un cotto fioc.

Il dolore si misura osservando le reazioni delle pazienti e chiedendo loro di valutarne l'intensità su una scala di valutazione numerica.



1-4 Swab test (modificato da "Manuale di colposcopia e patologia del tratto genitale inferiore"; F. Murina-2018)

1.5 Trattamento della vulvodinia

Non esiste un approccio terapeutico standardizzato per la vulvodinia, ma diverse strategie di trattamento che devono essere personalizzate attraverso uno schema multimodale. Un adeguato standard di igiene e comportamentale, come l'uso di appropriati detergenti per il bucato e biancheria intima con caratteristiche ipoallergeniche, sono il primo consiglio che ogni medico dovrebbe dare alle pazienti con vestibolodinia.

I punti chiave del programma di trattamento dovrebbero essere la riduzione dei fattori trigger e degli stimoli irritativi, il blocco della sensibilizzazione periferica e centrale, la riduzione dell'ipertono della muscolatura del pavimento pelvico e l'azione sulle disfunzioni psicosessuali associate alla malattia.²³

La stimolazione nervosa elettrica transcutanea (Transcutaneous electrical nerve stimulation, TENS) è una tecnica che consente di effettuare una neuromodulazione attraverso uno stimolo elettrico. Si è dimostrato che la TENS può essere significativamente utile nella cura della vestibolodinia (risposta positiva del 70% ca), ma è essenziale utilizzare parametri di stimolazione appropriati e validati.

Gli antidepressivi triciclici costituiscono un'opzione farmacologica appropriata per il trattamento della vulvodinia, in particolare per il dolore spontaneo e generalizzato. Usata originariamente per la depressione, questa classe di farmaci è oggi comunemente prescritta per la cura del dolore cronico, e l'amitriptilina è fra i triciclici il principio più usato. Il rationale è che gli antidepressivi e, in particolare l'amitriptilina, hanno una potente azione antinfiammatoria, probabilmente mediata da un'azione antagonista sulla degranolazione mastocitaria, cui si aggiunge un possibile effetto inibitorio sulla percezione del dolore di tipo centrale. La dose iniziale di amitriptilina deve essere bassa (6-10mg), e va aumentata gradualmente sino a quando la paziente risponde alla cura o manifesta inaccettabili effetti collaterali.

Diverse tecniche si possono utilizzare per correggere l'ipertono della muscolatura pelvica. Queste comprendono esercizi di rilassamento, massaggio interno (vaginale) ed esterno, pressione sui trigger point, biofeedback elettromiografico e dilatatori vaginali.

Si dovrebbe sempre indagare la presenza di problemi sessuali che possano costituire un fattore predisponente, precipitante o di mantenimento della vulvodinia, come pregressi abusi fisici o sessuali, nonché esperienze emotive avverse (per esempio, divorzio dei genitori, aborti, parti difficoltosi). Dal momento che la convivenza con il dolore genitale cronico ha spesso conseguenze sul piano psicosessuale, alcune pazienti possono trarre beneficio da un counseling o da una terapia sessuologica.

Bibliografia

Aagaard, Kjersti, et al. «The human microbiome project strategy for comprehensive sampling of the humane microbiome and why it matters.» *FASEB Journal*, 2013.

²³ (Henzell H 2017)

- Andrew T. Goldstein, Caroline F. Pukall, Candace Brown, Sophie Bergeron, Amy Stein, Susan Kellog-Spadt. «Vulvodynia: assesment and treatment.» *The journal of sexual medicine*, 2016.
- Corsini-Munt S, Rancourt KM, Dubé JP, Rossi MA, Rosen NO. «Vulvodynia: a consideration of clinical and methodological research challenges and recommended solutions.» *Journal of pain researche*, 2017.
- Erin Eppsteiner, Lori Boardman, Colleen K. Stockdale. «vulvodynia.» *Elsevier*, 2014.
- FitzGerald MP, Payne CK, Lukacz ES, Yang CC, Peters KM, Chai TC, Nickel JC, Hanno PM, Kreder KJ, Burks DA, Mayer R, Kotarinos R, Fortman C, Allen TM, Fraser L, Mason-Cover M, Furey C, Odabachian L, Sanfield A, Chu J, Huestis K, Tata GE, Dugan N, Sheth. «Randomized multicenter clinical trial of myofascial physical therapy in women with interstitial cystitis/painful bladder syndrome and pelvic floor tenderness.» *Journal of Urology*, 2012.
- FitzGerald, M. P., e R. Kotarinos. «Rehabilitation of the short pelvic floor. I: Background and patient evaluation.» *Internetonial Urogynecology Journal*, 2003.
- G. Ventolini, S.E. Gygax, M.E. Adelson, D.R. Cool. «Vulvodynia and fungal association: a preliminary report.» *Elsevier*, 2013.
- Goldstein AT, Stockdale CK, Bergeron S, Pukall C, Zolnoun D, Coady D. «consensus vulvar pain terminology committee of the International Society for the Study of Vulvovaginal Disease (ISSVD).» *The Journal of Sexual Medicine*, 2016.
- Graziottin, A., e F. Murina. *Vulvar pain from childhood to old age*. 2017.
- Green, Katherine A., M.D. |Zarek, Shvetha M., M.D. |Catherino, William H., M.D., Ph.D. «Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract.» *Fertility and Sterility*, 2015.
- Henzell H, Berzins K, Langford JP. «Provoked vestibulodynia: current perspectives.» *International Journal of Women's Health*, 2017.
- Huttenhower, Curtis, et al. «structure, function and diversity of the healthy human microbiome.» *Nature*, 2012.
- JC, Andrews. «Vulvodynia interventions--systematic review and evidence grading.» *Obstetrican and gynecological survey*, 2011.
- Keppel Hesselink JM, Kopsky DJ, Sajben N. «New topical treatment of vulvodynia based on the pathogenetic role of cross talk between nociceptors, immunocompetent cells, and epithelial cells.» *Journal of pain research*, 2016.
- King M, Rubin R, Goldstein AT. «Current uses of surgery in the treatment of genital pain.» *Sexual Medicine*, 2015.
- Latremoliere A, Woolf CJ. «Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity.» *Journal of pain*, 2009.
- Logan M. Havemann, David R. Coll, Pascal Gagneux, Michael P. Markey, Jerome L. Yaclik, Rose A. Maxwell, Ashvin Iyer, Steven R. Lindheim. «vulvodynia: what we know and where we should be going.» *Journal of lower genital tract disease*, 2017.
- Methé, Barbara A, et al. «A framework for human microbiome research.» *Nature*, 2012.

- ML Falsetta, DC Foster, AD Bonham, RP Phipps. «A review of the available clinical therapies for vulvodynia management and new data implicating proinflammatory mediators in pain elicitation.» *An International Journal Of Obstetrics and Gynaecology*, 2016.
- Morin M, Carroll MS, Bergeron S. «Systematic Review of the Effectiveness of Physical Therapy Modalities in Women With Provoked Vestibulodynia.» *Sexual medicine reviews*, 2017.
- Morrissey D, El-Khawand D, Ginzburg N, Wehbe S, O'Hare P 3rd, Whitmore K. «Botulinum Toxin A Injections Into Pelvic Floor Muscles Under Electromyographic Guidance for Women With Refractory High-Tone Pelvic Floor Dysfunction: A 6-Month Prospective Pilot Study.» *Female Pelvic Medicine and Reconstructive Surgery*, 2015.
- Murina F., Bianco V., Radici G., Felice R., Di Martino M., Nicolini U. «Transcutaneous electrical nerve stimulation to treat vestibulodynia: a randomised controlled trial.» *European Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2018.
- Murina F., Felice R., Di Francesco S., Oneda S. «Vaginal diazepam plus transcutaneous electrical nerve stimulation to treat vestibulodynia: A randomized controlled trial.» *European Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2018.
- Murina, Filippo. *Manuale di colposcopia e patologia del tratto genitale inferiore*. Edizioni Minerva medica, s.d.
- . *Vulvar Pain*. Springer, 2017.
- Nguyen RH, Turner RM, Rydell SA, Maclehorse RF, Harlow BL. «Perceived stereotyping and seeking care for chronic vulvar pain.» *Pain Medicine*, 2013.
- Pukall, Caroline F, et al. «Vulvodynia: Definition, Prevalence, Impact, and Pathophysiological Factors.» *The Journal of sexual medicine*, 2016.
- Reed BD, Caron AM, Gorenflo DW, Haefner HK. «Treatment of vulvodynia with tricyclic antidepressants: efficacy and associated factors.» *Journal of lower genital tract disease*, 2006.
- Reed BD, Harlow SD, Sen A, Legocki LJ, Edwards RM, Arato N, Haefner HK. «Prevalence and demographic characteristics of vulvodynia in a population-based sample.» *American Journal of Obstetrics and gynecology*, 2012.
- Reed, Barbara D, Sioban D Harlow, Melissa A Plegue, e Ananda Sen. «Remission, Relapse, and Persistence of Vulvodynia: A Longitudinal Population-Based Study.» *Journal of Women's Health*, 2016.
- Ruban, Gilbert G. G. Donders & Gert Bellen & Kateryna S. «Abnormal vaginal microbioma is associated with severity of localized provoked vulvodynia. Role of aerobic vaginitis and Candida in the pathogenesis of vulvodyni.» *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2018.
- Sideri M., Murina F., Bianco V. *The Role of Vulvoscopy in the Evaluation of Dyspareunia*. 2009.
- Susan Kellogg-Spadt, Natalie O. Rosen · Samantha J. Dawson · Melissa Brooks ·. «Treatment of Vulvodynia: Pharmacological and Non-Pharmacological Approaches.» *Springer Nature Switzerland*, 2019.
- team, The 2017 NIH-wide microbiome workshop writing. «2017 NIH-wide workshop report on “The Human Microbiome: Emerging Themes at the Horizon of the 21st Century” .» 2019.
- Vieira-Baptista P, Donders G, Margesson L, Edwards L, Haefner HK, Pérez-López FR. «Diagnosis and management of vulvodynia in postmenopausal women.» *Maturitas*, 2018.

2 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Numerose evidenze suggeriscono che l'infiammazione giochi ruolo centrale nello sviluppo della vestibolodinia. Si ipotizza che l'infiammazione persistente della mucosa vestibolare possa promuovere l'iperplasia delle fibre C nocicettive, secondaria alla produzione dell'NGF ed all'aumento persistente delle sostanze pro-infiammatorie. Le infezioni vulvovaginali sono spesso citate come elemento determinante nello scatenamento dei processi infiammatori alla base dello sviluppo, mantenimento e riacutizzazione della vestibolodinia.

Obiettivi del presente studio sono stati quelli di dimostrare l'ipotesi che uno stimolo infettivo ripetuto od un'alterata ecologia microbica della vagina e/ o perivestibolare primitiva o conseguente ad infezioni vulvo-vaginali recidivanti, possano essere fattori promuoventi, di mantenimento o riacutizzazione della sintomatologia lamentata dalle pazienti con vestibolodinia.

Le ipotesi che si sono volute soddisfare sono state le seguenti:

- Esistono differenze nel microbioma vaginale tra donne con vestibolodinia e donne sane asintomatiche?
- Esistono differenze tra il microbioma vaginale e quello perivestibolare in donne con vestibolodinia in confronto a donne sane asintomatiche?
- Esiste una correlazione tra il microbioma vaginale/perivestibolare e la sintomatologia delle donne con vestibolodinia?

3 MATERIALI E METODI

In questo studio osservazionale caso-controllo sono state arruolate donne affette da vestibolodinia, definita come dolore limitato al vestibolo durante i rapporti sessuali od a seguito di stimolazione o pressione dell'area vestibolare (es. inserimento assorbenti interni, utilizzo di indumenti aderenti etc.) con persistenza dei sintomi da almeno 3 mesi in assenza di patologie vulvo-vaginali clinicamente evidenziabili.

Donne in età fertile afferenti all'ambulatorio di ginecologia sono state inserite nello studio quale gruppo di controllo, contraddistinte dall' assenza di anamnesi per vulvodinia, segni d'infezione del tratto genitale inferiore attuali o recenti (<3 mesi) od altre patologie ginecologiche.

Ogni donna è stata informata riguardo le procedure inerenti allo studio, sottoscrivendo un consenso informato.

I criteri di esclusione sono elencati nella tabella 1.

Tabella 1: criteri di esclusione allo studio
-Infezione vulvo-vaginale attiva o recente (<3 mesi)
-Gravidanza in corso
-Sanguinamento genitale di origine sconosciuta
-Utilizzo di antibiotici e/o antimicotici nei 14 giorni precedenti l'arruolamento
-Età <18 anni e donne in post-menopausa (assenza di mestruazioni >12 mesi)

Ogni partecipante allo studio ha completato un dettagliato questionario riguardante le caratteristiche demografiche, l'anamnesi medica e ginecologica con particolare riferimento a storia di pregresse infezioni vulvo-vaginali. In ogni donna, inoltre, si è provveduto ad eseguire una visita ginecologica con vulvosopia.

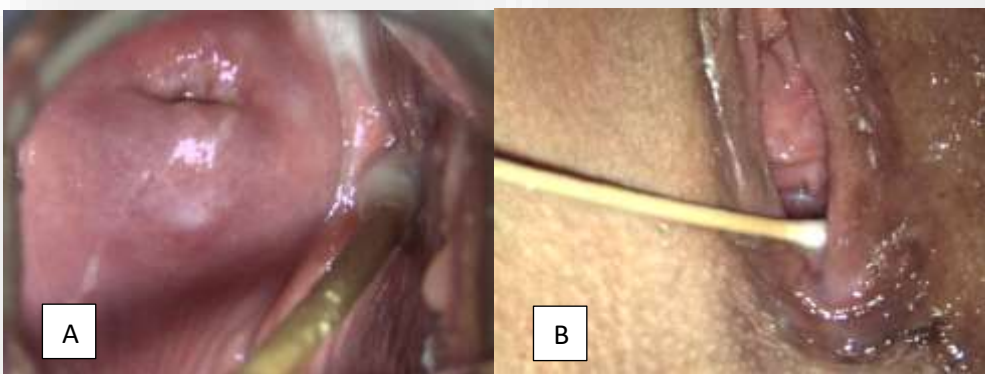
Nelle pazienti con vestibolodinia sono stati esaminati i seguenti elementi clinico-sintomatologici:
-*Bruciore/dolore vulvare e dispareunia* valutati attraverso una scala analogica visiva (VAS) con range 0-10 (0 = no dolore; 10 = peggior dolore possibile).

-*Valutazione tramite cotton della sensibilità vestibolare (swab test)*. Il test consiste nell'applicare con leggera pressione un cotton sulla superficie vestibolare, ottenendo una media dei valori

registrati in diverse sedi del vestibolo, immaginando il quadrante di un orologio alle ore 1, 3, 5, 6, 7, 9 e 11 e chiedendo di valutare soggettivamente il dolore percepito in una scala analogica visiva da 1 (no dolore) a 10 (peggior dolore possibile).

Successivamente, si è proceduto ad eseguire un prelievo sequenziale vaginale (adiacente al fornice laterale) e perivestibolare (Fig.3-1) attraverso lo sfregamento di un tampone dedicato e posizionato immediatamente in adeguata soluzione di conservazione, finalizzato alla raccolta del materiale per l'analisi del microbioma.

Figura 3-1: Modalità di prelievo del campione per l'analisi del microbioma. a) prelievo vaginale; b) prelievo perivestibolare



Alle partecipanti allo studio è stato chiesto di astenersi da rapporti sessuali con penetrazione nelle 24 ore antecedenti alla raccolta del campione, come pure si è proceduto al prelievo in assenza di sanguinamento cervico-vaginale (mestruazioni e perdite ematiche atipiche).

Sintesi delle procedure dello studio
-Raccolta dell'anamnesi medica ed ostetrico-ginecologica
-Valutazione dei sintomi nelle pazienti con vestibolodinia: bruciore/dolore e dispareunia (VAS 0-10)
-Esame obiettivo ginecologico
-Vulvosopia
-Cotton swab test
-Prelievo vaginale (adiacente fornice laterale) e perivestibolare per valutazione del microbioma

I campioni sono stati inviati per l'analisi del microbioma presso il Probiogenomics lab. afferente al Dipartimento di Chimica dell'Università di Parma. La parziale sequenza genica 16 S rRNA è stata

amplificata dall'estrazione del DNA usando coppie primer Probio_Uni and/Probio_Rev, che individuano la sequenza genica della regione V3 del 16 S rRNA.²⁴ La sequenza genica amplificata è stata ulteriormente processata impiegando il 16 S Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol (Part no. 15044223 Rev. B—Illumina). L'analisi del profilo microbiologico dei dati 16 S rRNA è stata condotta utilizzando script personalizzati sviluppati per la suite software QIIME 2. I risultati dell'analisi 16S rRNA sono stati ottenuti utilizzando il database Silva v. 132, mentre quelli dell'analisi ITS dei lattobacilli sono stati ottenuti utilizzando un database personalizzato contenente le sequenze ITS dei lattobacilli al momento sequenziati.

Step di sequenziamento attraverso l'utilizzo del gene 16S rRNA

- Estrazione del DNA dal campione da esaminare
- Amplificazione di regioni ipervariabili del gene 16S rRNA, preferibilmente la V3-V4 per una accurata caratterizzazione del microbiota
- Preparazione delle library mediante indicizzazione, purificazione e pooling dei campioni
- Sequenziamento su apposite piattaforme ed analisi bioinformatica delle sequenze ottenute

Si è calcolato che una dimensione del campione di 18 donne in ogni gruppo di studio sarebbe stata necessaria al fine di avere l'80% di potenza per rilevare un 1-log cambiamento di densità microbica, sulla base del t-test per campioni in relazione (paired t-test) ed una deviazione standard comune pari ad una differenza di densità microbica di 2,1 come da osservazione in uno studio precedente sul microbiota vaginale normale.²⁵

Per identificare la possibile correlazione tra le unità tassonomiche e la scala analogica visiva (VAS), è stato calcolato il coefficiente di correlazione Pearson attraverso il software SPSS v. 22 (IBM SPSS Statistics for Windows, Versione 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

²⁴ (Milani 2013)

²⁵ (Beamer MA 2017)

4 RISULTATI

Sono state arruolate nello studio 20 pazienti affette da vestibolodinia in accordo ai criteri d'inclusione ed afferenti all' ambulatorio di patologia vulvare facente parte del Servizio di Patologia Vulvare dell'Ospedale V. Buzzi di Milano. Queste sono state poste a confronto con 18 donne prive di patologia (gruppo di controllo). Non si sono rilevate differenze statisticamente significative tra i due gruppi per quanto riguarda le caratteristiche demografiche ed anamnestiche, con riferimento all'età, BMI, periodicità mestruale, contraccezione e pregresse gravidanze (Tab.1). Le caratteristiche clinico-anamnestiche delle pazienti con vestibolodinia sono riassunte nella Tabella 2.

Tabella 1. Caratteristiche demografiche ed anamnestiche delle donne inserite nello studio

	Gruppo vestibolodinia (n.20)	Gruppo controllo (n.18)	Valore p
-Età (anni)*	32,5 (\pm 8,2)	34 (\pm 6,2)	NS
-BMI [§]	22,4 (\pm 1,5)	23,1 (\pm 2,2)	NS
-Mestruazioni [°]			NS
-Regolari (25-35gg)	18	18	
-Polimenorrea (<25gg) -Oligomenorrea (>35gg)	1 1	1 1	
-Contracezione [°]			NS
-Nessuna -Estro-progestinica	13 7	12 6	

*Dati espressi come media \pm DS ; ° dato espresso come numero di pazienti.

[§]BMI (BodyMassIndex)=kg/m²,dato espresso come media

Tabella 2: Caratteristiche anamnestiche e cliniche delle pazienti con vestibolodinia

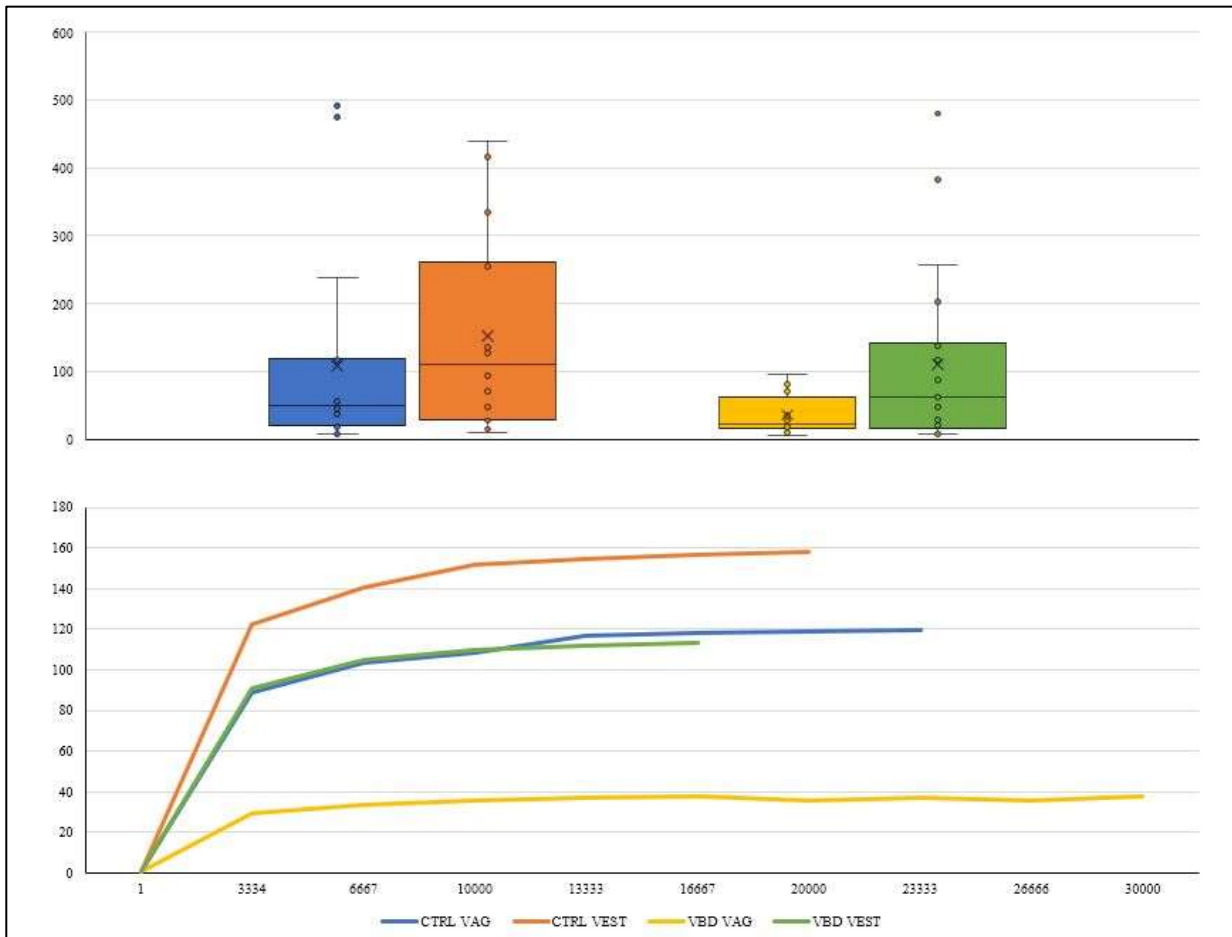
Parametro	Valori
-Durata di malattia (mesi)*	28,5 (\pm 31,1)
-Anamnesi di vulvo-vaginiti recidivanti [°]	11/20 (55%)
-Bruciore/dolore (VAS)*	5,8 (\pm 1,6)
-Dispareunia (VAS)*	7,3 (\pm 2,4)
-Swab test*	6,2 (\pm 1,9)

²*Dati espressi come media \pm DS ; ° dato espresso come numero di pazienti (%)

L'analisi della biodiversità (Fig. 1) espressa dalla curva di rarefazione, ha evidenziato come i campioni vestibolari abbiano una complessità batterica superiore rispetto a quelli vaginali sia nel

gruppo con vestibolodinia che in quello di controllo, sebbene non risultino differenze statisticamente significative tra i due gruppi.

Figura 4-1: Curva di biodiversità microbiologica nei campioni vaginali (VAG) e vestibolari (VEST) nel gruppo di controllo (CTRL) ed in quello con vestibolodinia (VBD)



Legenda : ascisse=numero di cloni della library; ordinate=taxonomic units

La comparazione delle unità tassonomiche di genere 16S mantenendo un cut-off di positività microbiologica \geq del 15%, ha fatto rilevare la presenza di 119 unità tassonomiche diverse sia nel gruppo di controllo che in quello di donne con vestibolodinia (Tab.3,4), a fronte di una presenza totale di 604 generi, con assenza di differenze statisticamente significative in relazione alla sede di prelievo (vaginale versus vestibolare) in entrambi i gruppi. Il genere maggiormente rappresentato in entrambi i gruppi è stato quello Lattobacillare.

Estrapolando, invece, la percentuale di generi dominanti intesi come quelli che costituiscono $>25\%$ della comunità microbiologica vaginale, si ritrovano 3 unità tassonomiche in entrambi i gruppi,

indipendentemente dalla sede di prelievo vaginale o vestibolare: *Lattobacilli*, *Gardnerella vaginalis* e *Bifidobacterium* nel gruppo di controllo e *Lattobacilli*, *Gardnerella* ed *Atopobium* nel gruppo di donne con vestibolodinia (Tab. 5).

Analizzando la popolazione lattobacillare si è rilevata la presenza di 22 specie e mantenendo un cut-off di positività > del 15%, queste si sono ridotte a 10 differenti.

Inoltre, si è osservata una percentuale rilevante di dominanza del *Lactobacillus gasseri* del 19,2 % nel gruppo vestibolodinia rispetto al gruppo di controllo, dove questa specie non ha presentato alcuna dominanza (Tab. 6, Fig. 2).

L'analisi della covarianza tra le specie Lattobacillari e la sintomatologia (bruciore/dolore e dispareunia) ha portato ad evidenziare una correlazione particolarmente significativa tra la presenza del *Lactobacillus gasseri*, l'intensità del bruciore/dolore e soprattutto la gravità della dispareunia, con valore rispettivamente di 0.255 e 0.357 con $p < 0.001$ (Tab 7).

Tabella 3. Unità tassonomiche di genere 16S (cut-off >15%) nel gruppo vestibolodinia in sede vaginale e vestibolare

Unità tassonomica*	controlli			
	Vagina		Vestibolo	
	% positiv	% dominat	% positiv	% dominat
Lactobacillus	94,12	64,71	100,00	64,71
Gardnerella	64,71	17,65	76,47	11,76
Bifidobacterium	70,59	5,88	82,35	5,88
U. m. of Nanohaloarchaea class	35,29	0,00	29,41	0,00
U. m. of Woesearchaea class	17,65	0,00	17,65	0,00
U. m. of Acidobacteriales order	17,65	0,00	0,00	0,00
Corynebacterium 1	17,65	0,00	35,29	0,00
Corynebacterium	17,65	0,00	11,76	0,00
Cutibacterium	70,59	0,00	76,47	0,00
Streptomyces	29,41	0,00	35,29	0,00
Atopobium	41,18	0,00	76,47	5,88
Collinsella	17,65	0,00	41,18	0,00
Bacteroides	94,12	0,00	88,24	0,00
Barnesiella	29,41	0,00	64,71	0,00
U. m. of Barnesiellaceae family	23,53	0,00	35,29	0,00
U. m. of Bacteroidales order	17,65	0,00	17,65	0,00
Butyricimonas	17,65	0,00	35,29	0,00
Odoribacter	52,94	0,00	64,71	0,00
Gram-negative bacterium cTPY-13	29,41	0,00	47,06	0,00
U. m. of Muribaculaceae family	76,47	0,00	82,35	0,00
Muribaculum	35,29	0,00	29,41	0,00
U. m. of p-2534-18B5 gut group family	23,53	0,00	5,88	0,00
Paraprevotella	29,41	0,00	58,82	0,00
Prevotella 1	23,53	0,00	11,76	0,00
Prevotella 2	17,65	0,00	29,41	0,00
Prevotella 7	52,94	0,00	76,47	0,00
Prevotella 9	47,06	0,00	82,35	0,00
Prevotellaceae NK3B31 group	58,82	0,00	70,59	0,00
Prevotellaceae UCG-001	52,94	0,00	64,71	0,00
Prevotella	41,18	0,00	47,06	0,00
Alistipes	70,59	0,00	82,35	0,00
Rikenellaceae RC9 gut group	58,82	0,00	64,71	0,00
Parabacteroides	52,94	0,00	70,59	0,00
Chryseobacterium	17,65	0,00	5,88	0,00
U. m. of env.OPS 17 family	35,29	0,00	29,41	0,00
Meiothermus	47,06	0,00	35,29	0,00
Sulfurovum	23,53	0,00	35,29	0,00
Anoxybacillus	35,29	0,00	41,18	0,00
Genella	17,65	0,00	17,65	0,00
Staphylococcus	47,06	0,00	52,94	0,00
Enterococcus	17,65	0,00	11,76	0,00
Streptococcus	64,71	0,00	70,59	0,00
Christensenellaceae R-7 group	52,94	0,00	76,47	0,00
Clostridium sensu stricto 13	17,65	0,00	17,65	0,00
Clostridium sensu stricto 1	41,18	0,00	41,18	0,00
U. m. of Clostridiales vadinBB60 group family	35,29	0,00	64,71	0,00
Anaerococcus	23,53	0,00	47,06	0,00
Ezakiella	17,65	0,00	5,88	0,00
Finegoldia	29,41	0,00	47,06	0,00
Peptoniphilus	29,41	0,00	41,18	0,00
Agathobacter	35,29	0,00	64,71	0,00
Blautia	47,06	0,00	58,82	0,00
Eisenbergiella	17,65	0,00	29,41	0,00
Eubacterium eligens group (Lachnospiraceae family)	58,82	0,00	70,59	0,00
Eubacterium xylanophilum group (Lachnospiraceae family)	17,65	0,00	35,29	0,00
Fusicatenibacter	17,65	0,00	29,41	0,00
Howardella	23,53	0,00	11,76	0,00

Tabella 4: Unità tassonomiche di genere 16S (cut-off >15%) nel gruppo di controllo in sede vaginale e vestibolare

Unità tassonomica*	controlli			
	Vagina		Vestibolo	
	%	%	%	%
	positiv	dominar	positiv	dominar
Lactobacillus	94,12	64,71	100,00	64,71
Gardnerella	64,71	17,65	76,47	11,76
Bifidobacterium	70,59	5,88	82,35	5,88
U. m. of Nanohaloarchaeia class	35,29	0,00	29,41	0,00
U. m. of Woesearchaeia class	17,65	0,00	17,65	0,00
U. m. of Acidobacteriales order	17,65	0,00	0,00	0,00
Corynebacterium 1	17,65	0,00	35,29	0,00
Corynebacterium	17,65	0,00	11,76	0,00
Cutibacterium	70,59	0,00	76,47	0,00
Streptomyces	29,41	0,00	35,29	0,00
Atopobium	41,18	0,00	76,47	5,88
Collinsella	17,65	0,00	41,18	0,00
Bacteroides	94,12	0,00	88,24	0,00
Barnesiella	29,41	0,00	64,71	0,00
U. m. of Barnesiellaceae family	23,53	0,00	35,29	0,00
U. m. of Bacteroidales order	17,65	0,00	17,65	0,00
Butyrimonas	17,65	0,00	35,29	0,00
Odoribacter	52,94	0,00	64,71	0,00
Gram-negative bacterium cTPY-13	29,41	0,00	47,06	0,00
U. m. of Muribaculaceae family	76,47	0,00	82,35	0,00
Muribaculum	35,29	0,00	29,41	0,00
U. m. of p-2534-18B5 gut group family	23,53	0,00	5,88	0,00
Paraprevotella	29,41	0,00	58,82	0,00
Prevotella 1	23,53	0,00	11,76	0,00
Prevotella 2	17,65	0,00	29,41	0,00
Prevotella 7	52,94	0,00	76,47	0,00
Prevotella 9	47,06	0,00	82,35	0,00
Prevotellaceae NK3B31 group	58,82	0,00	70,59	0,00
Prevotellaceae UCG-001	52,94	0,00	64,71	0,00
Prevotella	41,18	0,00	47,06	0,00
Alistipes	70,59	0,00	82,35	0,00
Rikenellaceae RC9 gut group	58,82	0,00	64,71	0,00
Parabacteroides	52,94	0,00	70,59	0,00
Chryseobacterium	17,65	0,00	5,88	0,00
U. m. of env.OPS 17 family	35,29	0,00	29,41	0,00
Meiothermus	47,06	0,00	35,29	0,00
Sulfurovum	23,53	0,00	35,29	0,00
Anoxybacillus	35,29	0,00	41,18	0,00
Gemella	17,65	0,00	17,65	0,00
Staphylococcus	47,06	0,00	52,94	0,00
Enterococcus	17,65	0,00	11,76	0,00
Streptococcus	64,71	0,00	70,59	0,00
Christensenellaceae R-7 group	52,94	0,00	76,47	0,00
Clostridium sensu stricto 13	17,65	0,00	17,65	0,00
Clostridium sensu stricto 1	41,18	0,00	41,18	0,00
U. m. of Clostridiales vadinBB60 group family	35,29	0,00	64,71	0,00
Anaerococcus	23,53	0,00	47,06	0,00
Ezakiella	17,65	0,00	5,88	0,00
Finegoldia	29,41	0,00	47,06	0,00
Peptoniphilus	29,41	0,00	41,18	0,00
Agathobacter	35,29	0,00	64,71	0,00
Blautia	47,06	0,00	58,82	0,00
Eisenbergiella	17,65	0,00	29,41	0,00
Eubacterium eligens group (Lachnospiraceae family)	58,82	0,00	70,59	0,00
Eubacterium xylanophilum group (Lachnospiraceae family)	17,65	0,00	35,29	0,00
Fusicatenibacter	17,65	0,00	29,41	0,00
Howardella	23,53	0,00	11,76	0,00
Lachnoclostridium	64,71	0,00	76,47	0,00
Lachnospiraceae NK4A136 group	70,59	0,00	76,47	0,00

Lachnospiraceae UCG-001	23,53	0,00	35,29	0,00
Lachnospira	47,06	0,00	58,82	0,00
Marvinbryantia	47,06	0,00	52,94	0,00
Roseburia	76,47	0,00	64,71	0,00
Ruminococcus gnavus group (Lachnospiraceae family)	17,65	0,00	29,41	0,00
U. m. of Lachnospiraceae family	17,65	0,00	41,18	0,00
Peptococcus	17,65	0,00	11,76	0,00
U. m. of Peptococcaceae family	17,65	0,00	17,65	0,00
Romboutsia	47,06	0,00	52,94	0,00
Butyricicoccus	17,65	0,00	41,18	0,00
Eubacterium coprostanoligenes group (Ruminococcaceae family)	35,29	0,00	52,94	0,00
Faecalibacterium	88,24	0,00	100,00	0,00
Fastidiosipila	23,53	0,00	23,53	0,00
Flavonifractor	23,53	0,00	29,41	0,00
Oscillospira	29,41	0,00	52,94	0,00
Ruminiclostridium 5	23,53	0,00	35,29	0,00
Ruminiclostridium 6	23,53	0,00	41,18	0,00
Ruminiclostridium 9	17,65	0,00	47,06	0,00
Ruminiclostridium	23,53	0,00	41,18	0,00
Ruminococcaceae NK4A214 group	17,65	0,00	29,41	0,00
Ruminococcaceae UCG-002	47,06	0,00	58,82	0,00
Ruminococcaceae UCG-003	17,65	0,00	23,53	0,00
Ruminococcaceae UCG-005	35,29	0,00	64,71	0,00
Ruminococcaceae UCG-010	52,94	0,00	52,94	0,00
Ruminococcaceae UCG-013	29,41	0,00	29,41	0,00
Ruminococcaceae UCG-014	35,29	0,00	58,82	0,00
Ruminococcus 1	41,18	0,00	58,82	0,00
Ruminococcus 2	23,53	0,00	52,94	0,00
Subdoligranulum	41,18	0,00	58,82	0,00
U. m. of Ruminococcaceae family	29,41	0,00	35,29	0,00
U. m. of MBA03 order	29,41	0,00	29,41	0,00
Asteroleplasma	23,53	0,00	35,29	0,00
Dubosiella	23,53	0,00	23,53	0,00
Turcibacter	29,41	0,00	47,06	0,00
Acidaminococcus	29,41	0,00	35,29	0,00
Phascolarctobacterium	35,29	0,00	41,18	0,00
Dialister	52,94	0,00	70,59	0,00
Megasphaera	17,65	0,00	11,76	0,00
Mitsuokella	17,65	0,00	29,41	0,00
Veillonella	35,29	0,00	47,06	0,00
Fusobacterium	23,53	0,00	29,41	0,00
Sneathia	17,65	0,00	11,76	0,00
Paracoccus	23,53	0,00	17,65	0,00
Roseovarius	17,65	0,00	23,53	0,00
U. m. of Rhodospirillales order	35,29	0,00	76,47	0,00
Sphingomonas	17,65	0,00	11,76	0,00
Bilophila	17,65	0,00	23,53	0,00
Desulfovibrio	17,65	0,00	23,53	0,00
Succinivibrio	17,65	0,00	17,65	0,00
Parasutterella	47,06	0,00	35,29	0,00
Sutterella	29,41	0,00	47,06	0,00
Hydrogenophilus	23,53	0,00	35,29	0,00
U. m. of Neisseriaceae family	23,53	0,00	35,29	0,00
Escherichia-Shigella	52,94	0,00	76,47	0,00
Haemophilus	23,53	0,00	23,53	0,00
Acinetobacter	29,41	0,00	58,82	0,00
Pseudomonas	35,29	0,00	35,29	0,00
Treponema 2	17,65	0,00	23,53	0,00
U. m. of Izimaplasmatales order	17,65	0,00	11,76	0,00
Ureaplasma	17,65	0,00	17,65	0,00
Akkermansia	64,71	0,00	70,59	0,00

Tabella 5: Analisi dei generi dominanti nei due gruppi di studio

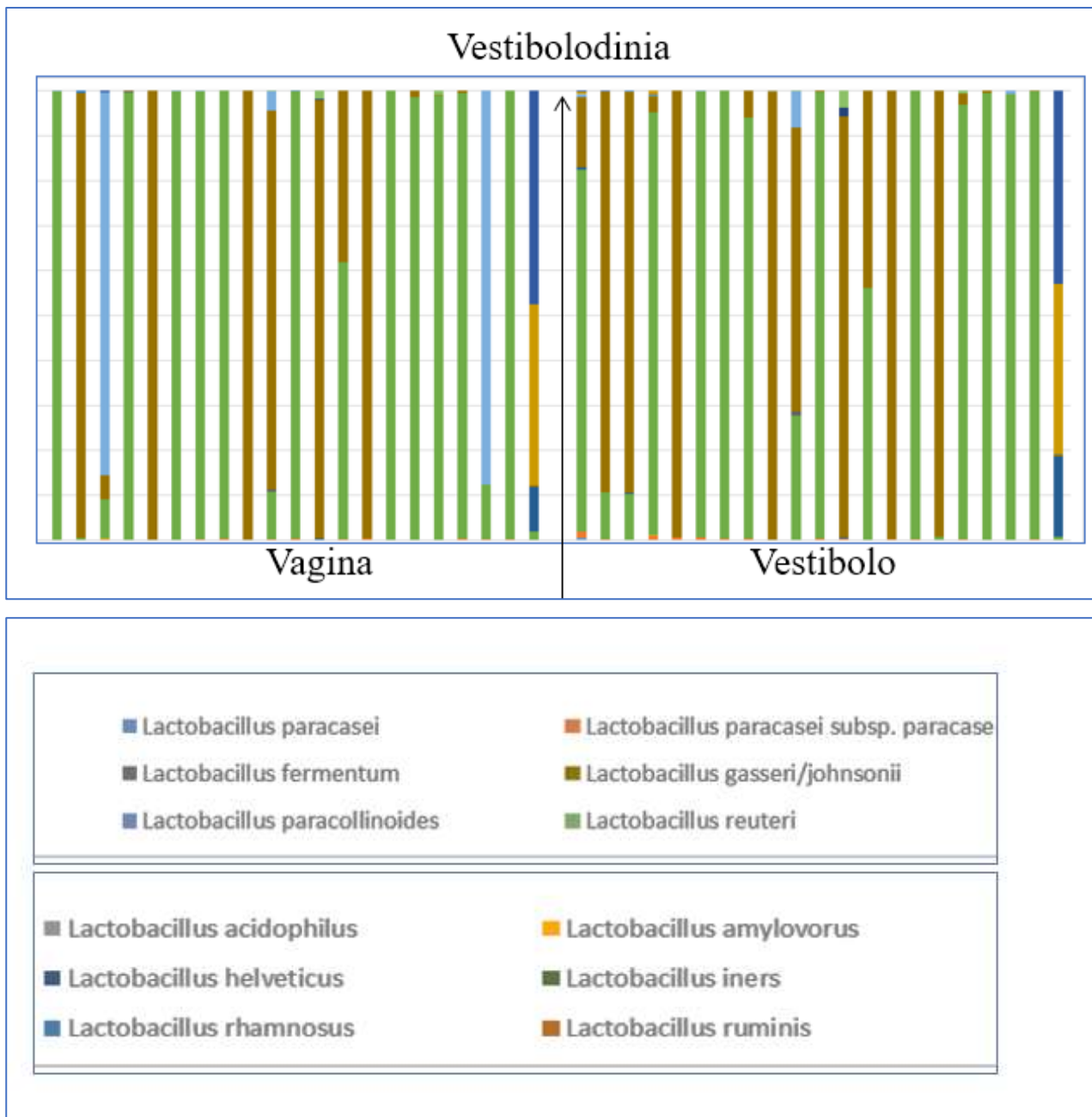
	CONTROLLI			
	Vagina		Vestibolo	
	%	%	%	%
Unità tassonomica	positiva	dominante	positiva	dominante
Lactobacillus	94,12	64,71	100,00	64,71
Gardnerella	64,71	17,65	76,47	11,76
Bifidobacterium	70,59	5,88	82,35	5,88

	VESTIBOLODINIA			
	Vagina		Vestibolo	
	%	%	%	%
Unità tassonomica	positiva	dominante	positiva	dominante
Lactobacillus	100,00	90,48	100,00	80,95
Gardnerella	28,57	4,76	61,90	9,52
Atopobium	23,81	9,52	47,62	9,52

Tabella 6: Distribuzione delle specie Lattobacillari nei due gruppi di studio

	VESTIBOLODINIA			
	Vagina		Vestibolo	
	%	%	%	%
Unità tassonomica	positiva	dominante	positiva	dominante
Lactobacillus crispatus	85,71	57,14	90,48	61,90
Lactobacillus iners	52,38	19,05	76,19	23,81
Lactobacillus gasseri	38,10	14,29	57,14	19,05
Lactobacillus salivarius	4,76	4,76	23,81	4,76
Lactobacillus plantarum	9,52	4,76	14,29	4,76
	CONTROLLI			
	Vagina		Vestibolo	
	%	%	%	%
Unità tassonomica	positiva	dominante	positiva	dominante
Lactobacillus crispatus	94,12	70,59	76,47	64,71
Lactobacillus iners	76,47	35,29	82,35	52,94
Lactobacillus jensenii	35,29	0,00	41,18	5,88

Figura 4-2: Rappresentazione grafica della distribuzione lattobacillare nei due gruppi di studio



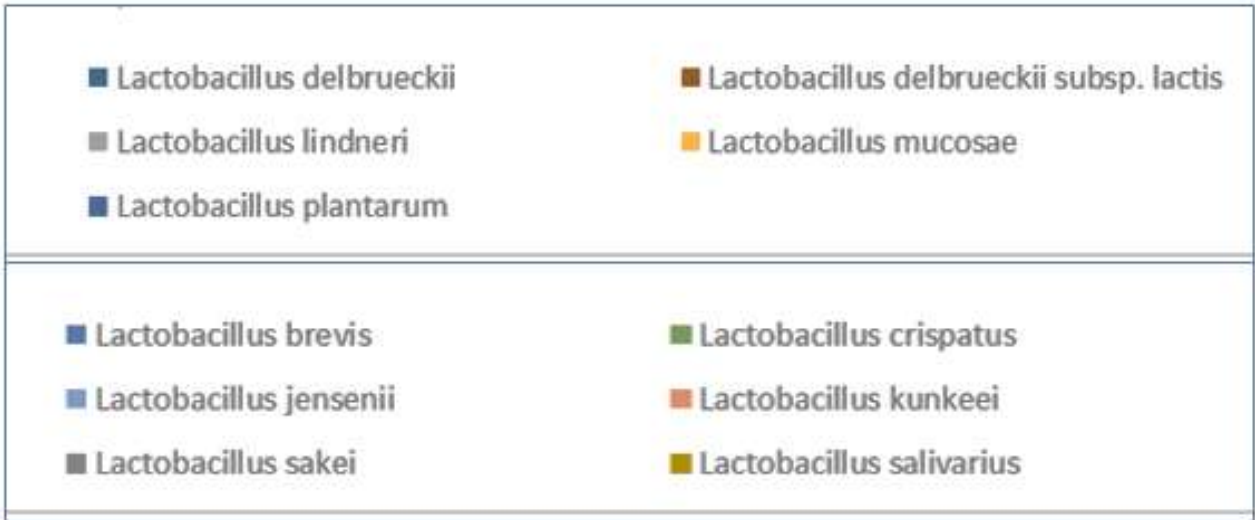
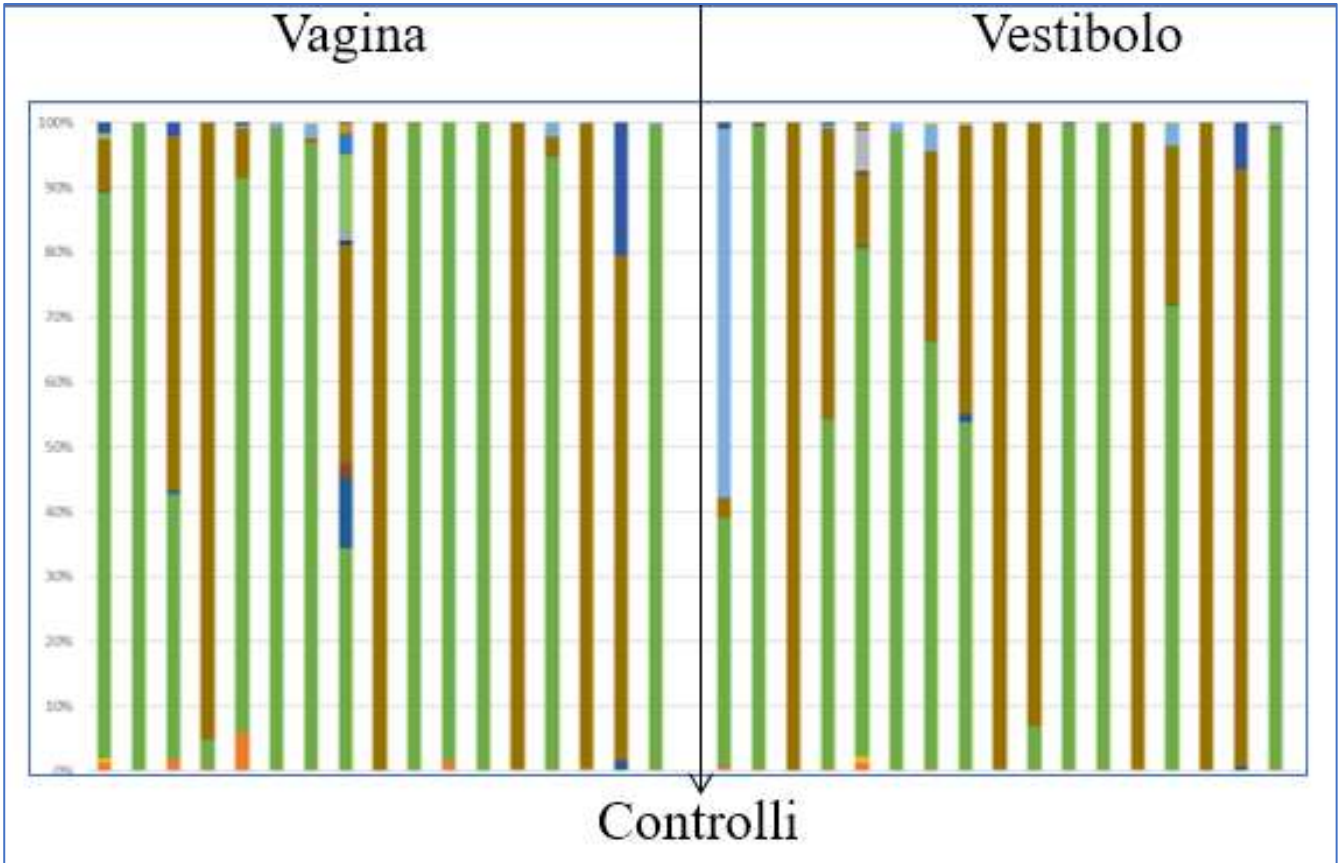


Tabella 7: Dati dell'analisi della covarianza tra le specie Lattobacillari e la sintomatologia (bruciore/dolore e dispareunia) nelle pazienti con vestibolodinia

Specie Lattobacillare	Dolore	Dispareunia
Lactobacillus paracasei subsp. paracasei	-0,208	-0,239
Lactobacillus acidophilus	0,223	0,119
Lactobacillus amylovorus	-0,102	-0,135
Lactobacillus crispatus	-0,177	-0,181
Lactobacillus delbrueckii	-0,215	-0,056
Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis	-0,138	-0,156
Lactobacillus fermentum	0,072	0,013
Lactobacillus gasseri	0,255	0,352*
Lactobacillus helveticus	0,013	-0,011
Lactobacillus iners	-0,001	-0,127
Lactobacillus jensenii	0,247	0,172
Lactobacillus kunkeei	-0,138	-0,156
Lactobacillus lindneri	-0,138	-0,156
Lactobacillus mucosae	-0,138	-0,156
Lactobacillus paracollinoides	-0,138	-0,156
Lactobacillus reuteri	-0,110	-0,124
Lactobacillus rhamnosus	-0,097	-0,157
Lactobacillus ruminis	-0,138	-0,156
Lactobacillus sakei	-0,255	-0,287
Lactobacillus salivarius	-0,142	0,115
Lactobacillus plantarum	-0,194	0,037

5 DISCUSSIONE

Il tratto genitale femminile inferiore è un complesso ecosistema in cui microrganismi, ormoni e cellule immunitarie interagiscono dinamicamente. Il microbiota vaginale, inteso come l'insieme dei microrganismi che risiedono nella vagina, è costituito da un complesso microambiente di comunità microbiologiche che tendono a fluttuare in relazione agli stimoli esogeni ed endogeni, consentendo così di svolgere un ruolo fondamentale nella prevenzione della colonizzazione da parte di microrganismi patogeni.

Il ruolo del microbiota vaginale quale fattore innescante, di mantenimento o di riattivazione della vestibolodinia non è stato ancora sufficientemente chiarito.

In condizioni normali il tratto genitale inferiore è costituito da una microflora primariamente caratterizzata da lattobacilli che conferiscono alla vagina una protezione antimicrobica patogena.

Le tecniche di sequenziamento genico di nuova generazione hanno consentito di identificare categorie (cluster) di microbiota vaginale, denominate Community State Types (CTS), nelle quali raggruppare popolazioni microbiche con specifiche caratteristiche, almeno fenotipiche.

Le comunità microbiche vaginali sono state raggruppate, con numerazione romana, in cinque CST.²⁶ Quattro di questi il I, II, III e V sono caratterizzati da una forte presenza di lattobacilli, quasi esclusivamente riconducibili ad un'unica specie all'interno del genere e da una bassa biodiversità.

Nella CST I domina la specie *Lactobacillus crispatus*, nella CST II la specie *Lactobacillus gasseri* ed infine nella CST III la specie *Lactobacillus iners*.

La CST IV è invece a bassissimo contenuto in lattobacilli, mostrando una totale assenza di un'unica specie batterica davvero dominante, con un'elevata biodiversità.

Infatti, nella CST IV è presente una miscela di anaerobi quali *Prevotella*, *Dialister*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, *Eggerthella*, *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Finegoldia* e *Mobiluncus*.

La CST I dimostra essere la comunità microbiologica vaginale più protettiva, mentre la CST IV è quella a maggior rischio di sviluppo di problematiche patologiche, su tutte la vaginosi batterica.

Un primo elemento riscontrato nel nostro studio è l'assenza di una differenza statisticamente significativa tra la popolazione microbica vaginale e quella perivestibolare, pur in presenza di una complessità batterica superiore in quest'ultimo gruppo da ascrivere verosimilmente ad una

²⁶ (Ravel J 2011)

contaminazione ambientale a bassa concentrazione, evidenza per altro già riscontrata in altri lavori presenti in letteratura.²⁷

Questo dato suggerirebbe come le secrezioni vaginali sono un'importante fonte di batteri presenti in sede vestibolare, con la conseguenza che ciò che accade in vagina condiziona in *un continuum* le modificazioni vestibolari.

L'analisi e la suddivisione in taxa dei microrganismi segue le regole della tassonomia, per cui quando si classifica un essere vivente, lo si inserisce in categorie via via più specifiche: per prima cosa lo si colloca in un regno (ad esempio il regno dei Bacteria), successivamente si individua una divisione o phylum (per esempio Firmicutes), poi viene la classe (es. Bacilli), l'ordine (es. Lactobacillales), la famiglia (es. Lactobacillaceae), il genere (es. Lactobacillus) ed infine la specie (es. crispatus).

L'evidenza nel nostro campione di studio di 119 unità tassonomiche diverse sia nel gruppo di controllo che in quello di donne con vestibolodinia, mantenendo un cut-off di positività microbiologica \geq del 15%, indica la complessità della nicchia biologica vestibolo-vaginale, dove però abbiamo riscontrato una netta prevalenza della popolazione lattobacillare anche nel gruppo di pazienti con vestibolodinia, elemento che indica l'assenza di un processo infettivo in atto.

Importanti elementi che differenziano i due gruppi di studio sono la presenza di *Lactobacilli gasseri* ed *Atopobium* nelle donne con vestibolodinia, l'evidenza di *Bifidobacterium* nei controlli ed il genere *Gardnerella* in entrambi i gruppi di studio.

L. gasseri rappresenta una componente del microbiota vaginale di donne sane^{28 29}, costituendo il profilo CST II evidente con una frequenza media del 5%.

Tuttavia, la sua presenza può fornire una minore capacità di difesa, con un equilibrio più precario che può facilmente evolvere verso una flora batterica instabile, come evidenziato in uno studio prospettico di donne in gravidanza.³⁰

L. gasseri potrebbe agire negativamente nei meccanismi di sviluppo dei processi infiammatori alla base della vestibolodinia, sia attraverso un meccanismo diretto che indiretto.

La sua azione indiretta potrebbe realizzarsi quale elemento determinante un equilibrio precario in grado di non arginare l'azione sinergica di *Atopobium+Gardenerella* nell'induzione di un microbioma patologico, con una più elevata percentuale di vulvo-vaginiti ad azione promuovente o riacutizzante la sintomatologia nocicettiva della vestibolodinia.

²⁷ (Jayaram A 2014)

²⁸ (Ravel J 2011)

²⁹ (G. e. al 2012)

³⁰ (H 2009)

Atopobium vaginae è una specie di batterio del genere Actinobacteria, della famiglia delle Coriobacteriaceae. Si tratta di coccobacilli anaerobici facoltativi, Gram-positivi a forma di bastone o ellittici che si trovano come elementi singoli o in coppie o catene corte.

Esistono studi che correlano questo microrganismo alla presenza di vaginosi batterica.

L'*Atopobium vaginae* è stato rilevato mediante PCR nel 96% dei pazienti con vaginosi batterica e solo nel 12%-19% di quelli con flora normale.³¹

I dati confermano l'implicazione di *Atopobium vaginae* nella vaginosi batterica; tuttavia, è stato rilevato il batterio in una proporzione maggiore di campioni classificati come dimostranti una flora normale. Questo suggerisce che la semplice individuazione di *Atopobium vaginae* ha uno scarso valore predittivo; tuttavia, i risultati suggeriscono anche che la quantificazione del germe quale predittore della vaginosi batterica, come pure è pressoché sempre presente in caso di microbioma patologico.

Un altro batterio dominante nel nostro studio è la *Gardnerella vaginalis*, anche essa frequentemente correlata alla vaginosi batterica.

Al tempo stesso è un batterio così spesso rintracciato nel microbiota vaginale da essere ritenuto da molti autori un vero e proprio commensale vaginale.

La coesistenza di *Atopobium vaginae* e *Gardnerella vaginalis* è stata recentemente documentata nel 78%-96% dei campioni di vaginosi batterica, mentre questa associazione era presente solo nel 5%-10% dei campioni di flora normale.³²

In un altro studio è stato dimostrato che la co-coltura di *Gardnerella vaginalis* e *Atopobium vaginae* con cellule epiteliali vaginali porta all'aumento delle citochine pro-infiammatorie (es. IL-6, IL-1 β , TNF α e IL-8) e chemochine (es. RANTES, MIP-1 β) così come dei peptidi antimicrobici (es. hBD-2).³³ Quanto detto può quindi spiegare il differente significato e ruolo della presenza di *Gardnerella vaginalis* in entrambi i nostri campioni.

Risultati simili sono già stati riscontrati in uno studio pilota sulla correlazione microbioma e vestibolodinia: il microbioma vaginale e vestibolare nella maggior parte delle donne con vestibolodinia conteneva gli stessi generi batterici, con un numero medio di generi per soggetto simile a quello delle donne di controllo.³⁴

³¹ (Rita Verhelst 2004)

³² (Jean-Pierre Menard 2008)

³³ (A.MacIntyre 2018)

³⁴ (Aswathi Jayaram s.d.)

I generi presenti nelle donne di controllo sono stati messi in parallelo a quelli riscontrati nelle indagini precedenti^{35 36} e sono state osservate differenze nella frequenza relativa di alcuni generi dominanti tra i due gruppi. *Gardnerella* e *Atopobium* sono stati identificati ad una frequenza più alta nella vagina e nel vestibolo in donne con VBD rispetto ai controlli.³⁷

Ulteriore evidenza della nostra sperimentazione è la presenza di *Bifidobacterium* solo nel gruppo di controllo. I Bifidobatteri sono uno dei gruppi microbici più degni di nota appartenenti all'Actinobacteria phylum.

Si ritiene che questi microrganismi conferiscano al suo ospite una serie di proprietà benefiche per la salute, come la modulazione della risposta immunitaria, la modulazione della fisiologia della mucosa dell'ospite e l'inibizione della proliferazione dei patogeni.

Inoltre, i Bifidobatteri sono associati ad un minor sviluppo di sintomi e segni legati all'atopia, elemento rilevante nella risposta infiammatoria delle donne con vestibolodinia.³⁸

È ipotizzabile che l'associazione di *L. crispatus* e *Bifidobacterium* presente nel gruppo di controllo, possa fungere da "scudo protettivo", anche in presenza di *Gardnerella* che pertanto può assumere un ruolo inoffensivo.

Inoltre, la stessa *Gardnerella* si può presentare in diversi tipi, ed in base al sottogruppo presente nella nicchia biologica vaginale, alla dotazione di vagilicina (citolisina ad azione proinfiammatoria) ed alla presenza di altre popolazioni co-dominanti, può assumere un ruolo più o meno importante nell'induzione e sviluppo d'infezione.³⁹

Pertanto, è possibile che la presenza di *Gardnerella* ritrovata nel gruppo vestibolodinia possa essere di un sottogruppo più aggressivo, che in sinergia ad *Atopobium* possa rendere più vulnerabile il microbiota vaginale di questa tipologia di donne.

L. gasseri, però, potrebbe svolgere anche un ruolo diretto nei meccanismi d'insorgenza della vestibolodinia. I nostri dati evidenziano come nell'analisi di covarianza il lactobacillo abbia un'associazione statisticamente significativa con la gravità della sintomatologia (dispareunia e dolore vulvare).

Questo elemento è in linea con studi sperimentali dove *L. gasseri* è stato associato ad elevati livelli di citochine infiammatorie esclusivamente in donne con vestibolodinia.⁴⁰

³⁵ (Ravel J 2011)

³⁶ (G. e. al 2012)

³⁷ (Aswathi Jayaram s.d.)

³⁸ (Di Pierro F 2018)

³⁹ (Albert AY 2015)

⁴⁰ (Aswathi Jayaram s.d.)

Inoltre, una presenza consistente di *L. gasseri* è stata trovata in sede vescicale in pazienti con sindrome della vescica dolorosa, comorbidità presente in circa il 40% delle donne con vestibolodinia, mentre si è evidenziata una ridotta rappresentazione di *Corynebacterium*, considerato essere benefico od addirittura protettivo nel contesto del microbioma vescicale polimicrobico delle donne asintomatiche.⁴¹

Lo studio condotto presenta alcuni limiti. La numerosità del campione non elevata potrebbe determinare una casualità dei rilievi microbiologici evidenziati.

Ciononostante, la presenza di *L. gasseri* nelle donne con vestibolodinia è stata già evidenziata in altri studi e la consistente correlazione del microrganismo con la gravità della sintomatologia, rafforza il nesso di causalità dei nostri risultati.

Inoltre, il campione da noi analizzato è formato da donne prevalentemente di razza caucasica e questo, secondo la letteratura⁴², può influire sulla diversa composizione microbica. Allo stesso modo potrebbe aver influenzato l'ecologia microbica la diversa fase del ciclo mestruale; infatti i campioni non sono stati raccolti in un preciso momento del ciclo. Infine, il prelievo di campioni vaginali e vestibolari nelle donne con VBD si è verificato molto tempo dopo l'inizio dei sintomi clinici. Pertanto, non possiamo escludere la possibilità che un unico genere batterico o una combinazione unica di batteri abbia fornito il primo, ma transitorio, fattore scatenante dell'insorgenza dei sintomi.

Bibliografia

- A.MacIntyre, PamelaPruskiaHolly V.LewisbcYun S.LeebJulian R.MarchesidePhillip R.BennettabZoltanTakatsaDavid. «Assessment of microbiota:host interactions at the vaginal mucosa interface.» *Methods*, 2018.
- AndreaLuglia, Gabriele, et al. «Phylogenetic classification of six novel species belonging to the genus *Bifidobacterium* comprising *Bifidobacterium anseris* sp. nov., *Bifidobacterium criceti* sp. nov., *Bifidobacterium imperatoris* sp. nov., *Bifidobacterium italicum* sp. nov., *Bifidobacterium*.» *Systematic and Applied Microbiology*, 2018.
- Aswathi Jayaram, Steven S. Witkin, Xia Zhou, Celeste J. Brown, Gustavo E. Rey, Iara M. Linhares, William J. Ledger & Larry J. Forney. «The bacterial microbiome in paired vaginal and vestibular samples from women with vulvar vestibulitis syndrome.» *Pathogens and Disease*, s.d.: 2014.
- Di Pierro, Francesco. «*Lactobacillus crispatus* M247.» In *Argomenti di Terapia Batterica*. 2019.
- G. Ventolini, S.E. Gygax, M.E. Adelson, D.R. Cool. «Vulvodinia and fungal association: a preliminary report.» *Medical hypothesis*, 2014.

⁴¹ (J. Curtis Nickel 2019)

⁴² (Di Pierro 2019)

- Hans Verstraelen, Rita Verhelst, Geert Claeys, Ellen De Backer, Marleen Temmerman and Mario Vaneechoutte. «Open AccessResearch article Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal.» *BMC Microbiology*, 2009.
- J. Curtis Nickel, Alisa J. Stephens-Shields, J. Richard Landis , Chris Mullins , Adrie van Bokhoven , M. Scott Lucia , Jeffrey P. Henderson , Bhaswati Sen , Jaroslaw E. Krol , Garth D. Ehrlich , and The MAPP Research Network. «A Culture-Independent Analysis of the Microbiota of Female Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome Participants in the MAPP Research Network.» *Journal of clinical Medicine*, 2019.
- Jean-Pierre Menard, Florence Fenollar, Mireille Henry, Florence Bretelle, and Didier Raoult. «Molecular Quantification of *Gardnerella vaginalis*.» *Clinical Infectious Diseases*, 2008.
- Nader-Macías, Virginia S Ocaña Aída A Pesce de Ruiz Holgado María Elena. «Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina.» *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1999.
- Rita Verhelst, Hans Verstraelen, Geert Claeys, Gerda Verschraegen. «Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed.» *BMC Microbiology*, 2004.
- Ruban, Gilbert G. G. Donders & Gert Bellen & Kateryna S. «Abnormal vaginal microbioma is associated with severity of localized provoked vulvodynia. Role of aerobic vaginitis and *Candida* in the pathogenesis of vulvodynia.» *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* , 2018.

6 CONCLUSIONI

Le evidenze del nostro studio indicano che le donne con vestibolodinia presentano un peculiare profilo del microbiota vaginale, che potrebbe svolgere un ruolo nell'insorgenza, nel mantenimento e nella riacutizzazione dei sintomi presenti nelle donne con vestibolodinia. Tutto ciò può porre le basi per individuare precocemente le donne a rischio di sviluppo della malattia, come pure consentire di avere un ulteriore target di cura rappresentato dal riequilibrio del microbiota vaginale.

7 BIBLIOGRAFIA

- A.MacIntyre, PamelaPruskaHolly V.LewisbcYun S.LeebJulian R.MarchesePhillip R.BennettZoltanTakatsaDavid. «Assessment of microbiota: host interactions at the vaginal mucosa interface.» *Methods*, 2018.
- Aagaard, Kjersti, et al. «The human microbiome project strategy for comprehensive sampling of the humane microbiome and why it matters.» *FASEB Journal*, 2013.
- AndreaLuglia, Gabriele, et al. «Phylogenetic classification of six novel species belonging to the genus Bifidobacterium comprising Bifidobacterium anseris sp. nov., Bifidobacterium criceti sp. nov., Bifidobacterium imperatoris sp. nov., Bifidobacterium italicum sp. nov., Bifidobacterium.» *Systematic and Applied Microbiology*, 2018.
- Andrew T. Goldstein, Caroline F. Pukall, Candace Brown, Sophie Bergeron, Amy Stein, Susan Kellog-Spadt. «Vulvodynia: assesment and treatment.» *The journal of sexual medicine*, 2016.
- Aswathi Jayaram, Steven S. Witkin, Xia Zhou, Celeste J. Brown, Gustavo E. Rey, Iara M. Linhares, William J. Ledger & Larry J. Forney. «The bacterial microbiome in paired vaginal and vestibular samples from women with vulvar vestibulitis syndrome.» *Pathogens and Disease*, s.d.: 2014.
- Corsini-Munt S, Rancourt KM, Dubé JP, Rossi MA, Rosen NO. «Vulvodynia: a consideration of clinical and methodological research challenges and recommended solutions.» *Journal of pain recherche*, 2017.
- Di Pierro, Francesco. «Lactobacillus crispatus M247.» In *Argomenti di Terapia Batterica*. 2019.
- Erin Eppsteiner, Lori Boardman, Colleen K. Stockdale. «vulvodynia.» *Elsevier*, 2014.
- FitzGerald MP, Payne CK, Lukacz ES, Yang CC, Peters KM, Chai TC, Nickel JC, Hanno PM, Kreder KJ, Burks DA, Mayer R, Kotarinos R, Fortman C, Allen TM, Fraser L, Mason-Cover M, Furey C, Odabachian L, Sanfield A, Chu J, Huestis K, Tata GE, Dugan N, Sheth. «Randomized multicenter clinical trial of myofascial physical therapy in women with interstitial cystitis/painful bladder syndrome and pelvic floor tenderness.» *Journal of Urology*, 2012.
- FitzGerald, M. P., e R. Kotarinos. «Rehabilitation of the short pelvic floor. I: Background and patient evaluation.» *Internetional Urogynecology Journal*, 2003.
- G. Ventolini, S.E. Gyax, M.E. Adelson, D.R. Cool. «Vulvodynia and fungal association: a preliminary report.» *Elsevier*, 2013.
- G. Ventolini, S.E. Gyax, M.E. Adelson, D.R. Cool. «Vulvodynia and fungal association: a preliminary report.» *Medical hypothesis*, 2014.
- Goldstein AT, Stockdale CK, Bergeron S, Pukall C, Zolnoun D, Coady D. «consensus vulvar pain terminology committee of the International Society for the Study of Vulvovaginal Disease (ISSVD).» *The Journal of Sexual Medicine*, 2016.
- Graziottin, A., e F. Murina. *Vulvar pain from childhood to old age*. 2017.

- Green, Katherine A., M.D. | Zarek, Shvetha M., M.D. | Catherino, William H., M.D., Ph.D. «Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract.» *Fertility and Sterility*, 2015.
- Hans Verstraelen, Rita Verhelst, Geert Claeys, Ellen De Backer, Marleen Temmerman and Mario Vanechoutte. «Open Access Research article Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal.» *BMC Microbiology*, 2009.
- Henzell H, Berzins K, Langford JP. «Provoked vestibulodynia: current perspectives.» *International Journal of Women's Health*, 2017.
- Huttenhower, Curtis, et al. «structure, function and diversity of the healthy human microbiome.» *Nature*, 2012.
- J. Curtis Nickel, Alisa J. Stephens-Shields, J. Richard Landis, Chris Mullins, Adrie van Bokhoven, M. Scott Lucia, Jeffrey P. Henderson, Bhaswati Sen, Jaroslaw E. Krol, Garth D. Ehrlich, and The MAPP Research Network. «A Culture-Independent Analysis of the Microbiota of Female Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome Participants in the MAPP Research Network.» *Journal of clinical Medicine*, 2019.
- JC, Andrews. «Vulvodynia interventions--systematic review and evidence grading.» *Obstetrical and gynecological survey*, 2011.
- Jean-Pierre Menard, Florence Fenollar, Mireille Henry, Florence Bretelle, and Didier Raoult. «Molecular Quantification of *Gardnerella vaginalis*.» *Clinical Infectious Diseases*, 2008.
- Keppel Hesselink JM, Kopsky DJ, Sajben N. «New topical treatment of vulvodynia based on the pathogenetic role of cross talk between nociceptors, immunocompetent cells, and epithelial cells.» *Journal of pain research*, 2016.
- King M, Rubin R, Goldstein AT. «Current uses of surgery in the treatment of genital pain.» *Sexual Medicine*, 2015.
- Latremoliere A, Woolf CJ. «Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity.» *Journal of pain*, 2009.
- Logan M. Havemann, David R. Coll, Pascal Gagneux, Michael P. Markey, Jerome L. Yaclik, Rose A. Maxwell, Ashvin Iyer, Steven R. Lindheim. «vulvodynia: what we know and where we should be going.» *Journal of lower genital tract disease*, 2017.
- Methé, Barbara A, et al. «A framework for human microbiome research.» *Nature*, 2012.
- ML Falsetta, DC Foster, AD Bonham, RP Phipps. «A review of the available clinical therapies for vulvodynia management and new data implicating proinflammatory mediators in pain elicitation.» *An International Journal Of Obstetrics and Gynaecology*, 2016.
- Morin M, Carroll MS, Bergeron S. «Systematic Review of the Effectiveness of Physical Therapy Modalities in Women With Provoked Vestibulodynia.» *Sexual medicine reviews*, 2017.
- Morrissey D, El-Khawand D, Ginzburg N, Wehbe S, O'Hare P 3rd, Whitmore K. «Botulinum Toxin A Injections Into Pelvic Floor Muscles Under Electromyographic Guidance for Women With Refractory High-

- Tone Pelvic Floor Dysfunction: A 6-Month Prospective Pilot Study.» *Female Pelvic Medicine and Reconstructive Surgery*, 2015.
- Murina F., Bianco V., Radici G., Felice R., Di Martino M., Nicolini U. «Transcutaneous electrical nerve stimulation to treat vestibulodynia: a randomised controlled trial.» *European Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2018.
- Murina F., Felice R., Di Francesco S., Oneda S. «Vaginal diazepam plus transcutaneous electrical nerve stimulation to treat vestibulodynia: A randomized controlled trial.» *European Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2018.
- Murina, Filippo. *Manuale di colposcopia e patologia del tratto genitale inferiore*. Edizioni Minerva medica, s.d.
- . *Vulvar Pain*. Springer, 2017.
- Nader-Macías, Virginia S Ocaña Aída A Pesce de Ruiz Holgado María Elena. «Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina.» *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1999.
- Nguyen RH, Turner RM, Rydell SA, Maclehose RF, Harlow BL. «Perceived stereotyping and seeking care for chronic vulvar pain.» *Pain Medicine*, 2013.
- Pukall, Caroline F, et al. «Vulvodynia: Definition, Prevalence, Impact, and Pathophysiological Factors.» *The Journal of sexual medicine*, 2016.
- Reed BD, Caron AM, Gorenflo DW, Haefner HK. «Treatment of vulvodynia with tricyclic antidepressants: efficacy and associated factors.» *Journal of lower genital tract disease*, 2006.
- Reed BD, Harlow SD, Sen A, Legocki LJ, Edwards RM, Arato N, Haefner HK. «Prevalence and demographic characteristics of vulvodynia in a population-based sample.» *American Journal of Obstetrics and gynecology*, 2012.
- Reed, Barbara D, Sioban D Harlow, Melissa A Plegue, e Ananda Sen. «Remission, Relapse, and Persistence of Vulvodynia: A Longitudinal Population-Based Study.» *Journal of Women's Health*, 2016.
- Rita Verhelst, Hans Verstraelen, Geert Claeys, Gerda Verschraegen. «Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed.» *BMC Microbiology*, 2004.
- Ruban, Gilbert G. G. Donders & Gert Bellen & Kateryna S. «Abnormal vaginal microbioma is associated with severity of localized provoked vulvodynia. Role of aerobic vaginitis and *Candida* in the pathogenesis of vulvodyni.» *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2018.
- Ruban, Gilbert G. G. Donders & Gert Bellen & Kateryna S. «Abnormal vaginal microbioma is associated with severity of localized provoked vulvodynia. Role of aerobic vaginitis and *Candida* in the pathogenesis of vulvodynia.» *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* , 2018.
- Sideri M., Murina F., Bianco V. *The Role of Vulvoscopy in the Evaluation of Dyspareunia*. 2009.
- Susan Kellogg-Spadt, Natalie O. Rosen · Samantha J. Dawson · Melissa Brooks ·. «Treatment of Vulvodynia: Pharmacological and Non-Pharmacological Approaches.» *Springer Nature Switzerland*, 2019.
- team, The 2017 NIH-wide microbiome workshop writing. «2017 NIH-wide workshop report on “The Human Microbiome: Emerging Themes at the Horizon of the 21st Century”.» 2019.

Vieira-Baptista P, Donders G, Margesson L, Edwards L, Haefner HK, Pérez-López FR. «Diagnosis and management of vulvodynia in postmenopausal women.» *Maturitas*, 2018.