



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SALUTE DELLA DONNA E DEL BAMBINO  
Direttore Prof. Giovanni Franco Zanon

CORSO DI LAUREA IN OSTETRICIA  
Presidente Prof. Giovanni Battista Nardelli

TESI DI LAUREA

**Prevalenza e diversità di microorganismi nel liquido amniotico e  
outcome della gravidanza a termine e parto pretermine**

Relatore: Dr.ssa Zambon Alessandra

Correlatori: Dr.ssa Sciro Manuela  
Dr.ssa Rossi Lucia

Laureanda: Marcato Paola

ANNO ACCADEMICO 2011/2012



*A Lorenzo, Serena e Anna*



# **INDICE**

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
1. Definizione	5
2. Fattori di rischio e complicanze	6
3. Patogenesi	8
4. Diagnosi	13
5. Management	18
SCOPO DELLO STUDIO	21
MATERIALI E METODI	23
Diagnostica microbiologica	25
1. Microscopia	25
2. Coltura	27
3. Antibiogramma	30
RISULTATI	31
DISCUSSIONE	41
CONCLUSIONI	45
BIBLIOGRAFIA	47
RINGRAZIAMENTI	53



## **RIASSUNTO**

### **▪ PRESUPPOSTI DELLO STUDIO**

L'invasione microbica della cavità amniotica, il successivo sviluppo di uno stato infiammatorio acuto e corioamnionite sono il principale fattore di rischio per l'insorgenza di parto pretermine, con un'incidenza del 40-70%. I patogeni più frequentemente isolati sono: Streptococco di Gruppo B (GBS), Escherichia Coli, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, Gardnerella vaginalis. La diagnosi è supportata, oltre che da segni clinici non sempre presenti, da markers materni quali PCR sierica, WBC count, tampone vaginale e rettale, markers fetali (dosaggio di citochine infiammatorie nel sangue fetale o nel liquido amniotico) ed esame istologico della placenta. Le conseguenze fetoneonatali dell'insorgenza di una corioamnionite sono molteplici e comprendono: prematurità, FIRS (fetal inflammatory response syndrome) e relative sequele come: sepsi neonatale, lesioni neurologiche (IVH, leucomalacia periventricolare), RDS e polmoniti, NEC, morte perinatale. Per quanto riguarda la madre, negli studi è stato riportato un aumento del rischio di taglio cesareo, emorragia post partum e sepsi puerperale.

### **▪ SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo dello studio è cercare di identificare le pazienti a rischio di infezione endoamniotica sulla base di dati clinici, anamnestici e di laboratorio. In particolare è stata studiata la relazione tra positività della coltura del liquido amniotico e outcome materno – neonatale della gravidanza.

### **▪ MATERIALI E METODI**

La casistica è composta da 29 gravidanze singole, 8 pretermine e 21 a termine. Criteri d'inclusione: per i parti a termine: tampone vaginale positivo, infezioni vaginali e urinarie recidivanti, intensa leucorrea a termine, PROM. Per i parti pre termine: MPP, pPROM, perdite ematiche in placenta normoinserita, iperpiressia sine causa, ipercontrattilità. Sono stati raccolti i seguenti campioni dei quali è stata eseguita coltura microbiologica: tampone vaginale e rettale, tampone vaginale e cervicale, liquido amniotico, sangue fetale, biopsia placentare parafunicolare, centrale, eccentrica. La placenta è stata inviata per esame istologico.

- **RISULTATI**

Nei casi di parto pretermine si è riscontrata positività alla coltura di liquido amniotico nel 62.5% dei casi (5 casi su 8) e nei casi di parto a termine il liquido amniotico è risultato positivo a coltura nel 47.6% dei casi (10 casi su 21). È stata identificata una correlazione con la diagnosi istologica di corioamnionite in 4 casi su 5.

- **CONCLUSIONI**

La coltura del liquido amniotico risulta essere una metodica affidabile e altamente sensibile nell'identificare un'invasione microbica della cavità amniotica e per il clinico può rappresentare uno strumento per poter condurre un buon *management* nei casi a rischio di sviluppo di una corioamnionite.



## **ABSTRACT**

### **▪ BACKGROUND**

The microbial invasion of the amniotic cavity, the subsequent development of an acute inflammatory state and chorioamnionitis are the main risk factor for the occurrence of preterm birth, with an incidence of 40-70%. The most frequently isolated pathogens are Group B Streptococcus (GBS), Escherichia coli, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, Gardnerella vaginalis. The diagnosis is supported not only by clinical signs, as they are not always present, but also by maternal markers such as CRP, WBC count, vagino-rectal swab, fetal markers (dosage of inflammatory cytokines in fetal blood or amniotic fluid) and histological examination of the placenta. The consequences of fetal-neonatal onset of chorioamnionitis are numerous and include: prematurity, FIRS (fetal inflammatory response syndrome) and related sequelae such as neonatal sepsis, neurological lesions (IVH, periventricular leukomalacia), RDS and pneumonia, NEC, perinatal death . For the mother, it has been reported a higher risk of caesarean section, postpartum hemorrhage and puerperal sepsis.

### **▪ AIM OF THE STUDY**

The purpose of the study is to try to identify patients at risk of infection endoamniotica on the basis of clinical data, medical history, laboratory. In particular, we studied the relationship between positive culture of amniotic fluid and maternal - neonatal outcome of pregnancy.

### **▪ MATERIAL AND METHODS**

The cohort consists of 29 single pregnancies, 8 preterm and 21 at term. Inclusion criteria: for at term deliveries: positive vaginal swab, recurrent urinary and vaginal infections, intense vaginal leucorrhea, PROM. For preterm deliveries: MPP, PPROM, vaginal bleeding, fever sine causa, hypercontractility. The following samples were collected and microbiological culture was performed: vaginal and rectal swab, vaginal and cervical swab, amniotic fluid, fetal blood, parafunicular, central and eccentric placental biopsy. The placenta was sent for histological examination.

- RESULTS

A positive amniotic fluid culture has been reported in the 62.5% cases of preterm delivery and in the 47.6% cases of at term delivery. In four cases it has been reported an histologic chorioamnionitis with a positive amniotic fluid culture.

- CONCLUSIONS

The amniotic fluid culture can ben considered as a sensible method to identify a microbial invasion of the amniotic cavity. For the clinics it can represent an instrument for a best management in cases of suspect chorioamnionitis and in those at risk.

## INTRODUZIONE

L'infezione perinatale è uno dei principali fattori di rischio di insorgenza di parto pretermine. Attualmente, il miglioramento dell'assistenza neonatologica e l'approfondimento delle conoscenze in campo ostetrico, permettono di ridurre tempestivamente i rischi materni e fetali<sup>1</sup>.

### 1. DEFINIZIONE

L'infezione endoamniotica, o corioamnionite, è definita come una risposta infiammatoria acuta delle membrane, della placenta e del liquido amniotico a un'invasione microbica della cavità amniotica.

È classificata in clinica e subclinica (o istologica): la prima è definibile come una vera e propria sindrome, sostenuta da alterazioni di tipo semeiologico, ematochimico, istologico e microbiologico; il tipo istologico non presenta sintomi clinici ma si manifesta con travaglio spontaneo pretermine o rottura prematura pretermine delle membrane (pPROM) e si riscontra solo successivamente con l'esame istologico degli annessi fetali<sup>2,3</sup>.

La corioamnionite complica tra lo 0.5% e il 10% delle gravidanze, approssimativamente tra lo 0.5% e il 2% delle gravidanze a termine<sup>4</sup>. Più alta è l'incidenza nelle pazienti pretermine: il riscontro di corioamnionite si presenta nel 40-70% dei casi di travaglio spontaneo pretermine e pPROM<sup>2</sup>.

## 2. FATTORI DI RISCHIO E COMPLICANZE

I principali fattori di rischio si riassumono in:

- Bassa età gestazionale (< 30 SG)<sup>5</sup>: a età gestazionali precoci corrisponde un maggior rischio di corioamnionite. A 24 SG il rischio è pari 67.9% e diminuisce con l'aumentare dell'età gestazionale (31.9% a 29 SG) (Grafico 1).

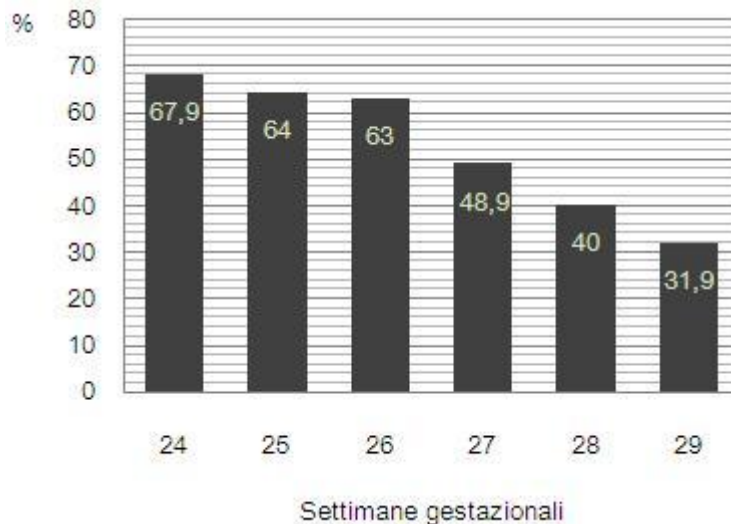


Grafico 1. Incidenza di corioamnionite a età gestazionali precoci<sup>5</sup>

- Vaginosi batterica: è identificata con un aumento di frequenza e concentrazione di Gardnerella vaginalis, Micoplasmi e anaerobi associati a una riduzione della prevalenza di Lactobacilli. Spesso si riscontra una vaginite caratterizzata da leucorrea con perdite grigie o biancastre lattescenti, di odore acre, omogenee, non viscosi, con pH > 5, spesso non accompagnate da prurito o bruciore<sup>30</sup>. La vaginosi batterica aumenta il rischio di parto pretermine, pPROM, infezione endoamniotica nel 15 – 20% delle gravidanze. In particolare, è associata al 38% dei parti pretermine e si riscontra nel 14% dei parti a termine<sup>2,4</sup>.
- Colonizzazione vaginale da Streptococco di gruppo B: tale microorganismo è presente nell'8.7% dei casi di parto pretermine e nel 17.6% dei parti a termine<sup>6</sup>.

- Batteriuria da Streptococco di gruppo B: tale microorganismo risulta presente nelle urine nel 10.7% dei casi di PROM, 15.3% dei parti pretermine e 3.3% dei casi di corioamnionite<sup>7</sup>. Il riscontro di Streptococco di gruppo B a livello urinario, deve essere considerato indice indiretto di colonizzazione vaginale<sup>28</sup>.
- Prolungata pPROM (>18 h)<sup>2</sup>
- Travaglio pretermine<sup>4</sup>
- Razza nera: il rischio è raddoppiato rispetto alle donne appartenenti ad altri gruppi razziali<sup>2,8</sup>
- Liquido amniotico tinto di meconio<sup>2,4</sup>
- Nulliparità, poiché in questi casi la durata del travaglio aumenta e quindi anche il rischio di invasione microbica della cavità amniotica<sup>2,4</sup>

Le complicanze dovute alla corioamnionite sono molteplici<sup>2</sup>:

- MATERNE: aumento di 2-3 volte del rischio di taglio cesareo, aumento di 2-4 volte dell'incidenza di endometrite, sepsi puerperale, infezione della ferita, ascesso pelvico, batteriemia, emorragia post partum.
- FETALI: morte perinatale, insufficienza multi organo, insufficienza respiratoria cronica, paralisi cerebrale, leucomalacia periventricolare.
- NEONATALI E A LUNGO TERMINE: basso peso alla nascita, sepsi neonatale, enterocolite necrotizzante (NEC), shock settico, polmonite, emorragia intraventricolare (IVH), morte.

### 3. PATOGENESI

#### 3.1. MECCANISMO D'INFEZIONE

L'invasione microbica della cavità amniotica avviene principalmente per via retrograda dal tratto genitale inferiore (cervice e vagina), spesso in presenza di rottura prematura delle membrane, ma è possibile che si verifichi anche a membrane integre.<sup>4</sup> Altre vie d'infezione comprendono quella ematica o transplacentare, quella retrograda legata alla migrazione dei microorganismi dalla cavità addominale attraverso le tube, e l'infezione trans uterina causata da procedure mediche quali amniocentesi e villocentesi<sup>4,8</sup>.

Il processo infettivo si può indicare in quattro fasi (Romero e Mazor, 1988)<sup>9</sup>: la prima fase è legata alla presenza dei patogeni nella cervice o in vagina, determinando una modificazione della flora microbica locale.

Nella seconda fase i microorganismi risalgono fino a giungere nello spazio corio deciduale; successivamente (terza fase) si insinuano tra corion e amnios. A questo punto i microorganismi possono invadere i vasi fetali e determinare una coriovasculite, o procedere fino a raggiungere il liquido amniotico.

La quarta ed ultima fase riguarda l'infezione fetale vera e propria, in cui il feto, ingerendo il liquido amniotico, ingerisce anche i microorganismi in esso contenuti.

In generale, in risposta alla presenza di agenti infettivi e al rilascio di endo ed esotossine, ha inizio una reazione infiammatoria materna e fetale: si attiva la produzione di citochine proinfiammatorie, quali TNF $\alpha$ , IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6, IL-8, che a loro volta stimolano la sintesi e il rilascio di prostaglandine e avviano la chemiotassi, l'infiltrazione e l'attivazione dei neutrofilo (Figura 1; Figura 2).

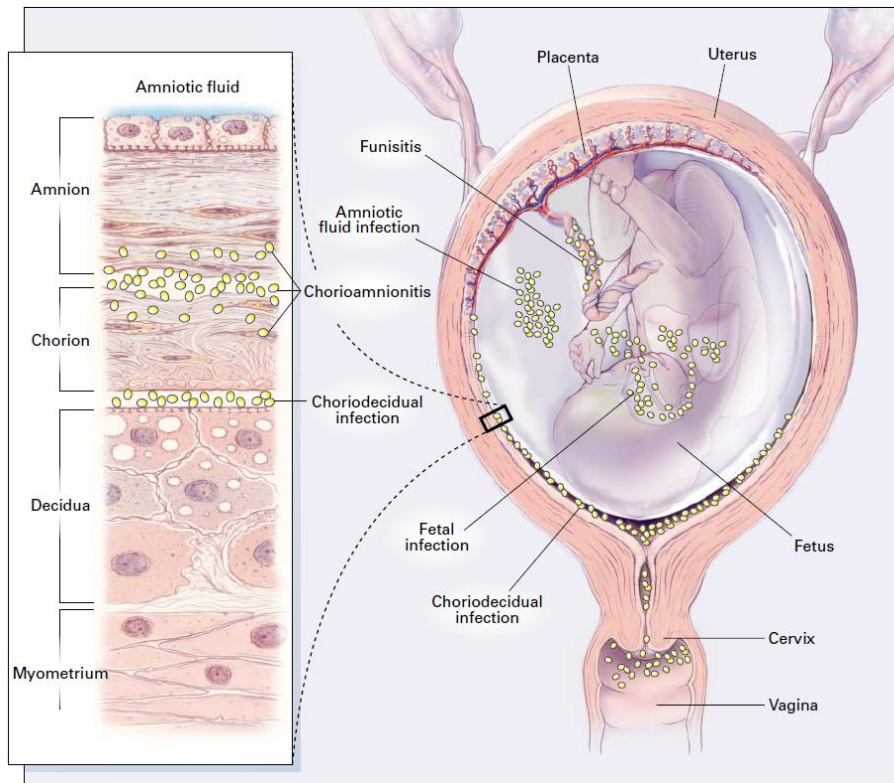


Figure 1. Potential Sites of Bacterial Infection within the Uterus<sup>8</sup>

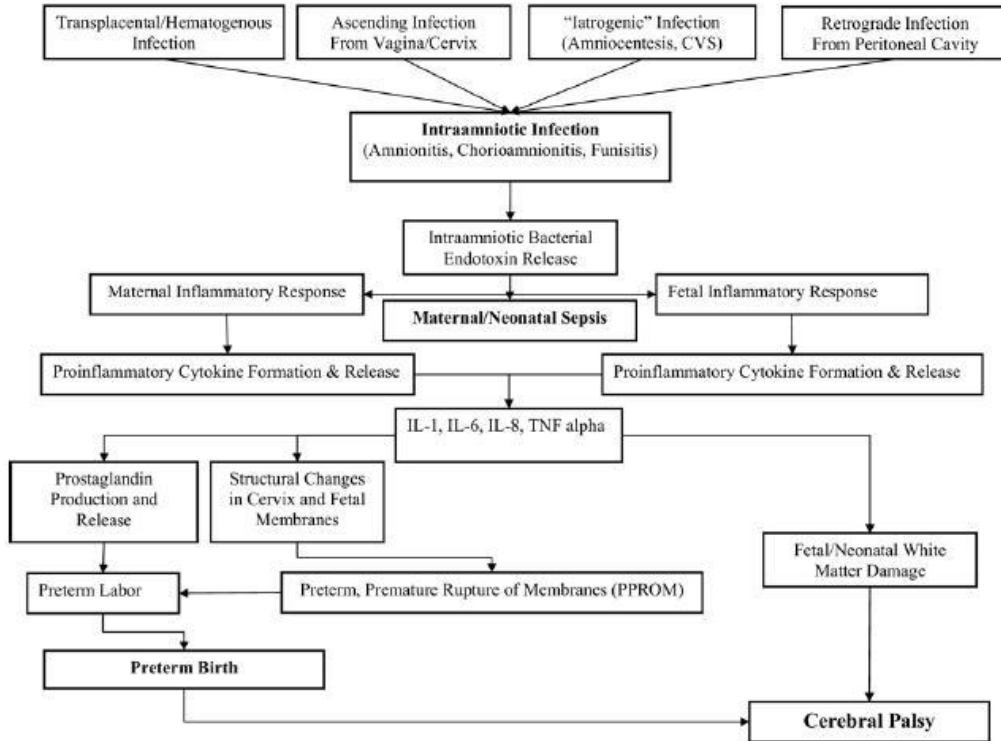


Figure 2. Pathogenesis of intra-amniotic infection<sup>8</sup>

### 3.2. AGENTI PATOGENI

I microorganismi più frequentemente responsabili dell'instaurarsi di una corioamnionite sono: Streptococco di Gruppo B, Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis, Gardnerella vaginalis, Escherichia Coli, Candida albicans. Treponema pallidum, Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis, Trichomonas vaginalis, Bacteroides spp hanno una rilevanza minore, in quanto la frequenza di corioamnionite dovuta a tali microorganismi è inferiore al 2%<sup>6</sup>.

#### 3.2.1. STREPTOCOCCO DI GRUPPO B

Lo Streptococco di Gruppo B è un batterio Gram positivo commensale del tratto gastrointestinale e genitourinario. Il 10-30% delle donne in gravidanza è portatrice di Streptococco di Gruppo B a livello vaginale e rettale. Nel secreto vaginale di donne che hanno partorito prima del termine della gravidanza, la prevalenza di questo microorganismo è pari all'8.7% e in quello di donne a termine è pari al 17.6%<sup>6</sup>.

Un'infezione dovuta a questo batterio è il maggior fattore di rischio per sepsi neonatale (1-4/1000 nati vivi)<sup>7</sup>. Clinicamente la sepsi da Streptococco si manifesta con polmonite, sindrome da distress respiratorio (RDS) e meningite nelle prime 24 ore di vita. L'infezione fetale insorge inizialmente quando lo Streptococco risale dalla vagina al liquido amniotico dopo l'inizio del travaglio o alla rottura delle membrane, anche se il microorganismo può invadere la cavità amniotica anche a membrane integre (Desa, Trevenen 1984); la trasmissione può avvenire anche al passaggio attraverso il canale da parto. Lo Streptococco viene quindi aspirato dal feto e può indurre batteriemia.

In uno studio del 1985 (Boyer, Gotoff) riguardante i fattori predittivi di sepsi neonatale da Streptococco di Gruppo B, il rischio aumenta di 6.5 volte nelle donne a età gestazionale < 37 SG, temperatura intrapartum > 37.5°C, rottura delle membrane > 12 ore rispetto a donne senza questi fattori di rischio<sup>10</sup>.

La prevenzione della sepsi da Streptococco di Gruppo B attualmente consiste nella somministrazione intrapartum di ampicillina (o clindamicina in caso di allergia), sulla base dei seguenti fattori di rischio per sepsi neonatale da Streptococco di Gruppo B: precedente gravidanza complicata da sepsi da Streptococco, batteriuria da Streptococco rilevata in gravidanza, travaglio pretermine, rottura delle membrane prolungata, febbre in travaglio. Utilizzando questa strategia, l'incidenza della sepsi



neonatale da Streptococco si è ridotta del 50-68.8%.

Lo screening batteriologico offerto a tutte le donne gravide comprende l'esecuzione di un tampone vaginale e rettale tra 35 e 37 settimane gestazionali. In caso di positività alla coltura, la paziente risulta candidata alla terapia in travaglio.

La combinazione di queste due metodiche di prevenzione ha consentito una riduzione del tasso di sepsi pari all'86%<sup>11</sup>.

### 3.2.2. MICOPLASMI: UREAPLASMA UREALYTICUM E MYCOPLASMA HOMINIS

Ureaplasma Urealyticum è un micoplasma presente nel 40-80% delle donne in età fertile. E' un commensale del tratto genitale inferiore. Una colonizzazione da Ureaplasma Urealyticum risulta responsabile di corioamnionite, infezione urinaria, travaglio pretermine e aborto spontaneo. Nei neonati determina polmonite, meningite e insufficienza respiratoria. Considerando un campione di 151 donne che hanno partorito tra 23 e 32 settimane, la coltura di biopsie placentari è risultata positiva per Ureaplasma nel 42% dei casi; in 41 casi di parto a termine di gravidanza tale percentuale è pari al 24%. Un importante fattore di rischio per l'infezione da Ureaplasma è la rottura prematura delle membrane: l'incidenza di PROM è pari 44% dei casi di coltura positiva<sup>12</sup>.

Mycoplasma Hominis è anch'esso un commensale del tratto genitale inferiore, ed è spesso isolato nel liquido amniotico assieme ad Ureaplasma Urealyticum nel 30% dei casi di travaglio pretermine o PROM con o senza sintomi clinici di corioamnionite<sup>2,6</sup>.

### 3.2.3. GARDNERELLA VAGINALIS

Gardnerella Vaginalis è un batterio Gram-positivo anaerobio commensale del tratto genitale inferiore. Un'aumentata colonizzazione da Gardnerella Vaginalis, associata anche a un aumento di Micoplasmi e batteri anaerobi, è un fattore determinante l'insorgenza di una vaginosi batterica. Gardnerella Vaginalis è isolato nel liquido amniotico del 25% dei casi di corioamnionite in parti pretermine<sup>2</sup>.

### 3.2.4. ESCHERICHIA COLI

Escherichia Coli è un bastoncello Gram-negativo presente nell'apparato gastrointestinale. E' il principale patogeno isolato nelle urine nei casi di batteriuria asintomatica ( $< 10^5$  UFC/ml), condizione comune in gravidanza (3-8%)<sup>13</sup>. Le complicanze materne legate a un'infezione da Escherichia Coli comprendono cistite, pielonefrite, batteriemia e sepsi (10% dei casi)<sup>2</sup>. Escherichia Coli è isolato nel liquido amniotico nell'8% dei casi di corioamnionite in parti pretermine<sup>2</sup>.

### 3.2.5. CANDIDA ALBICANS

I funghi del genere Candida sembrano essere gli unici che invadono la cavità amniotica con maggiore frequenza. Tra le diverse specie, Candida albicans è quella più frequentemente isolata nel liquido amniotico. Nei casi di pPROM, la coltura del liquido amniotico risulta positiva per Candida spp. nel 3.2% dei casi<sup>29</sup>.

#### 4. DIAGNOSI

L'infezione endouterina è spesso cronica e risulta asintomatica fino all'insorgenza del travaglio o alla rottura delle membrane. Spesso però, molte donne che successivamente risultano positive a corioamnionite sulla base dell'esame istologico placentare e colture microbiologiche rimangono asintomatiche anche a travaglio avviato<sup>8</sup>.

Clinicamente, la corioamnionite è definita come febbre materna superiore a 38°C associata a uno o più dei seguenti segni e sintomi: leucocitosi materna ( $> 15000$  cellule/mm<sup>3</sup>), tachicardia materna ( $> 100$  bpm), tachicardia fetale ( $> 160$  bpm), ipercontrattilità e dolorabilità uterina, liquido amniotico maleodorante. È importante segnalare che, considerati singolarmente, tali segni e sintomi non sono specifici per infezione endoamniotica. In assenza di altre patologie, la combinazione di tre dei suddetti criteri è sufficiente per formulare un'accurata diagnosi di corioamnionite.

Qualora si sospetti l'insorgenza di un'infezione intrauterina in assenza di sintomi clinici, ad esempio nei casi di travaglio pretermine o pPROM, parametri sierici e test sul liquido amniotico possono aiutare nel formulare la diagnosi. Il gold standard per la diagnosi di infezione endoamniotica è la coltura del liquido amniotico<sup>14</sup>.

##### 4.1. FEBBRE IN TRAVAGLIO

La febbre intrapartum è definita come una temperatura  $\geq 38^\circ\text{C}$  in due determinazioni a distanza di un'ora; ha una frequenza pari al 1.6-14.6% dei parti ed è considerata un importante fattore di rischio per complicanze infettive neonatali, quali encefalopatia neonatale, insufficienza respiratoria e morte.

Nei casi di corioamnionite a termine tale sintomo è stato riscontrato in travaglio nel 70% dei casi<sup>15</sup>. In caso di febbre e anestesia loco regionale in corso, è opportuno considerare che il rialzo della temperatura sia indotto dai farmaci utilizzati.

#### 4.2. LEUCOCITOSI MATERNA

Per leucocitosi si intende un numero di cellule superiore a  $15 \times 10^9/l$  oppure  $>15.000-18.000$  cellule/ $mm^3$ <sup>4,16</sup>. La leucocitosi materna è riportata in circa il 70-90% dei casi di corioamnionite clinica. Qualora si riscontrasse come segno isolato, occorre fare diagnosi differenziale con altre condizioni che inducono leucocitosi, quali l'insorgenza del travaglio di parto, dolore, anestesia e uso di steroidi. Pertanto, nel monitoraggio di casi ad alto rischio, come pPROM, il solo dosaggio dei leucociti non è sufficiente per prevedere l'insorgenza di corioamnionite<sup>2</sup>.

#### 4.3. TACHICARDIA MATERNA e FETALE

La tachicardia materna ( $> 100$  bpm) e quella fetale ( $> 160$  bpm) hanno un'alta frequenza nei casi di corioamnionite, rispettivamente 50-80% e 40-70%. Questo sintomo può essere presente in assenza di corioamnionite, ad esempio quando si utilizzano farmaci quali efedrina, antistaminici, beta agonisti<sup>2</sup>.

#### 4.4. IPERCONTRATTILITA', DOLORABILITA' UTERINA e LIQUIDO AMNIOTICO MALEODORANTE

L'ipercontrattilità, la dolorabilità uterina e la presenza di liquido amniotico maleodorante sono state riportate nel 4-25% dei casi di corioamnionite a termine<sup>2</sup>.

#### 4.5. LIQUIDO AMNIOTICO

Il campione di liquido amniotico da esaminare può essere raccolto tramite amniocentesi o alla rottura delle membrane.

Il *gold standard* per identificare la presenza di un'invasione microbica della cavità amniotica e per fare diagnosi di corioamnionite è la coltura microbiologica<sup>14</sup>. In particolare, si riscontra positività alla coltura di liquido amniotico nel 30% dei casi di pPROM<sup>17</sup>, nel 34% dei casi di rottura prematura delle membrane a termine e nel 19% delle pazienti in travaglio a termine con membrane integre<sup>31</sup>.

Un'altra metodica utilizzata per l'analisi del liquido amniotico è quella molecolare (*broad-range PCR*), che consente di identificare il DNA del patogeno.

Nel 2010 è stato eseguito uno studio che confronta le due metodiche su un campione di pazienti in cui è stata riscontrata pPROM. L'utilizzo della sola coltura microbiologica sottostima la prevalenza d'invasione microbica della cavità amniotica: infatti, il tasso

d'invasione microbica della cavità amniotica è pari al 34% utilizzando la coltura microbiologica, ed è pari al 45% utilizzando la PCR. Da ciò deriva che la metodica molecolare ha maggiore significatività clinica, nonostante la coltura microbiologica sia il metodo più utilizzato<sup>17</sup>.

Oltre all'identificazione dei microorganismi, si ricorre anche alla conta di globuli bianchi nel liquido amniotico. Circa il 99% dei neutrofili presenti nel liquido amniotico sono di origine fetale; pertanto la *WBC count* consente di identificare la presenza o meno di una risposta infiammatoria fetale all'infezione<sup>18</sup>. Una conta  $>30.000$  WBC/mm<sup>3</sup> è suggestiva di corioamnionite<sup>2</sup>.

La presenza di uno stato infiammatorio intra-amniotico sembra essere determinante per l'insorgenza di parto pretermine e complicanze infettive neonatali (sepsi, polmonite, meningite, NEC, IVH) quanto la presenza di microorganismi nella cavità amniotica<sup>19</sup>. Per questo motivo si ricorre al dosaggio delle citochine nel liquido amniotico. Nel 2012 è stato condotto uno studio su un campione di donne a età gestazionali  $\geq 34$  SG e  $< 34$  SG con pPROM, ed è stato riscontrato che la risposta infiammatoria risulta più elevata a età gestazionali  $< 34$  SG, così come il tasso di invasione microbica della cavità amniotica e corioamnionite istologica, pari al 44% e 57%<sup>19</sup>.

#### 4.6. PROTEINA C – REATTIVA (PCR) SIERICA

La PCR è una proteina di fase acuta secreta dal fegato in risposta a uno stato infiammatorio<sup>20</sup>. Un rialzo di tale proteina oltre i 5 mg/L è indicativo d'infezione.

Sono stati eseguiti numerosi studi riguardo il ruolo della PCR sierica nella diagnosi di corioamnionite. Sulla base di una review del 2011 riguardante casi di PPROM riscontrati in epoca gestazionale  $< 37$  SG, i dati riscontrati sono vari: per alcuni un rialzo della PCR sierica sembra essere correlato con la diagnosi di corioamnionite istologica nel 54.6% dei casi e corioamnionite clinica nel 25.8% dei casi, mentre per altri tale correlazione è valida nel 26-30% dei casi di corioamnionite istologica, quasi quanto quella clinica<sup>21</sup>. Basandosi sulla letteratura esistente, si può concludere che non è ancora possibile definire la PCR un fattore predittivo di corioamnionite nei casi di PPROM.

#### 4.7. SANGUE FETALE

Si preleva dall'arteria ombelicale a secondamento avvenuto o dopo il taglio del cordone. Secondo uno studio del 2011, il dosaggio PCR e procalcitonina (PCT) nel sangue arterioso ombelicale coadiuva la diagnosi di infezione neonatale insorta nella prima settimana di vita. In risposta all'infezione, infatti, la concentrazione di entrambe le proteine nel sangue cordonale risulta aumentata<sup>16</sup>.

#### 4.8. ESAME ISTOLOGICO DEGLI ANNESSI FETALI

L'esame istologico della placenta eseguito dopo la nascita permette di identificare le alterazioni placentari legate all'instaurarsi di una corioamnionite.

Le indicazioni per esame istologico della placenta legate a corioamnionite sono: infezione sospetta o confermata, parto pretermine (soprattutto se precedente a 34 settimane gestazionali), febbre materna, liquido amniotico tinto di meconio, rottura delle membrane > 24 ore, ricovero del neonato in unità intensiva neonatale, morte endouterina, pH del sangue ombelicale < 7.0, punteggio di Apgar < 6 a 5 minuti, rianimazione neonatale<sup>4</sup>.

Istologicamente la corioamnionite è caratterizzata da infiammazione acuta delle membrane, del funicolo e del piatto placentare in risposta a un'invasione microbica o altri processi patologici ed è associata a pPROM e parto pretermine nel 60% dei casi<sup>22</sup>.

L'esame istopatologico consiste nell'osservazione di sezioni di tessuto quali corion-decidua, amnios, piatto coriale, cordone ombelicale.

La corioamnionite si definisce con la presenza di aggregati di neutrofili nei tessuti: in particolare l'infiammazione di corion-decidua e amnios è definita dalla presenza di un campo con più di 5 neutrofili, e l'infiammazione acuta del piatto coriale è definita dalla presenza di un campo con più di 10 neutrofili<sup>9,23</sup>.

In caso di funisite si identifica la presenza di neutrofili polimorfonucleati di origine fetale nella gelatina di Wharton del cordone ombelicale. In caso di vasculite ombelicale, il reperto istologico evidenzia la presenza di neutrofili fetali nel lumen delle arterie o nella vena ombelicale, solitamente lungo la direzione della superficie amniotica del cordone. Funisite e vasculite ombelicale sono segnali di risposta infiammatoria fetale<sup>23</sup>.

#### 4.9. BATTERIURIA ASINTOMATICA e URINOCOLTURA

La batteriuria asintomatica è definita come colonizzazione batterica persistente del tratto urinario senza manifestazioni sintomatologiche. La prevalenza nelle donne in gravidanza è compresa tra 2% e 5%<sup>24</sup>. La batteriuria asintomatica è considerato un fattore di rischio di invasione microbica della cavità amniotica, parto pretermine e infezione neonatale<sup>10,7</sup>. E' inoltre responsabile del 30-40% dei casi d'insorgenza di pielonefrite. Occorre pertanto ripetere la ricerca di batteri nelle urine nel corso della gravidanza<sup>13</sup>. La coltura urinaria (o urino coltura) con urine prelevate da mitto intermedio è il test che con maggiore accuratezza consente di isolare lo specifico microorganismo patogeno, determinarne la sensibilità antibiotica e indirizzare la scelta della terapia, basata su penicillina o macrolidi. Il test è considerato positivo per una crescita maggiore o uguale a  $10^5$  UFC/ml<sup>24</sup>. Il microorganismo più frequentemente isolato è Escherichia Coli (8%)<sup>13</sup>, seguito dallo Streptococco di Gruppo B (2-7%)<sup>10</sup>.

#### 4.10. TAMPONE VAGINALE, CERVICALE e RETTALE

Il tampone vaginale è un esame diagnostico che viene eseguito tramite un prelievo di materiale utilizzando un tampone ovattato e il cui scopo è quello di verificare l'eventuale presenza di microrganismi patogeni responsabili di processi infettivi a carico della vagina (tampone vaginale), della cervice uterina (tampone cervicale) e del retto (tampone rettale).

L'esecuzione di un tampone vaginale e rettale a termine di gravidanza (35-37 SG) risulta essere il test più sensibile (79-97%) e specifico per determinare la presenza di colonizzazione batterica e quindi per identificare il rischio di trasmissione dei microrganismi al momento del parto. In particolare, il tampone eseguito presso il termine di gravidanza ha come scopo la ricerca in primis dello Streptococco di Gruppo B, che viene più frequentemente isolato eseguendo un tampone vaginale e rettale: ricercando il microorganismo utilizzando anche il tampone rettale il tasso di positività sale al 27%, rispetto al 22% con solo tampone vaginale<sup>10,11</sup>.

E' stato scelto questo range temporale in quanto il valore predittivo positivo di un esame colturale eseguito a più di 5 settimane dal parto è basso e risulta di scarsa utilità clinica (valore predittivo negativo pari al 95-98%)<sup>10,24</sup>.

## 5. MANAGEMENT

In caso di riscontro di corioamnionite è raccomandato iniziare la terapia antibiotica ed espletare il parto.

Non sono presenti studi che confrontino l'efficacia di diversi regimi terapeutici. La terapia antibiotica raccomandata consiste nella combinazione tra ampicillina (2 gr endovena ogni 6 ore) e gentamicina (1.5 mg/kg ogni 8 ore). Questi antibiotici risultano efficaci nel controllare infezioni da Streptococco di Gruppo B ed Escherichia Coli, i due principali microorganismi che causano corioamnionite e sepsi neonatale<sup>14</sup>. Un'altra categoria di antibiotici, i macrolidi, è specifica per altre specie microbiche quali *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. viridans*, *S. aureus*, Clostridi, *N. gonorrhoeae*, *Mycoplasma sp.*, *Chlamydiae*<sup>25</sup>. In questa categoria di farmaci rientrano eritromicina, claritromicina, azitromicina etc.

La terapia antibiotica dopo il parto non è significativa nel ridurre la morbidità materna legata all'insorgenza di corioamnionite: in uno studio del 2003, Edwards et al. dimostrarono che il tasso di endometrite post partum rimane invariato anche in caso di antibiotico-terapia post partum<sup>14</sup>.

Nei casi di PROM a termine di gravidanza, attualmente non vi sono evidenze che l'induzione del travaglio riduca il tasso di corioamnionite. L'induzione del travaglio di parto in questa casistica va valutato sulla base delle condizioni materne e fetali al momento del ricovero, quali lo status della cervice, l'anamnesi ostetrica, la presenza o meno di colonizzazione vaginale da Streptococco di Gruppo B e il benessere fetale (monitoraggio cardiotocografico)<sup>4</sup>.

Per le donne che presentano rottura pretermine delle membrane, l'antibiotico-terapia consente di ridurre l'incidenza di corioamnionite, morbidità neonatale e può prolungare la durata della gravidanza<sup>8</sup>. Secondo un assessment dell'American College of Obstetricians and Gynecologists del 2009, qualora s'instaurasse un travaglio di parto pretermine è consigliato iniziare la terapia antibiotica per prevenire l'infezione da Streptococco di Gruppo B. Se si decide per un trattamento conservativo della gravidanza, è consigliabile somministrare antibiotici ad ampio spettro per ridurre il rischio di infezione neonatale<sup>26</sup>.

L'utilizzo di corticosteroidi nei casi di minaccia di parto pretermine tra 24 e 32 settimane gestazionali per indurre la maturazione polmonare è consentito anche in caso di riscontro di sintomi clinici di corioamnionite. Secondo una review di Goldenberg, Andrews, et al., la somministrazione di corticosteroidi in gravidanze in età gestazionale



inferiore a 32 settimane con segni d'infezione materni non ha determinato significative differenze per quanto riguarda il tasso di morbidità neonatale. In un'altra review di Baud, Zupan et al., l'utilizzo di corticosteroidi è associato a una riduzione dei casi di sindrome da distress respiratorio, IVH e leucomalacia periventricolare in parti pretermine con riscontro di corioamnionite espletati al di sotto di 33 settimane gestazionali<sup>14</sup>.

La corioamnionite è un'indicazione all'espletamento del parto, ma non è un'indicazione per taglio cesareo, che va eseguito solo per indicazioni ostetriche assolute (sofferenza fetale grave, distacco intempestivo di placenta normalmente inserita, sproporzione feto pelvica, prolasso di funicolo<sup>27</sup>). Si nota, comunque, che l'infezione endoamniotica è associata a un'aumentata incidenza di distocie in travaglio, e quindi a un aumento del rischio di taglio cesareo<sup>4</sup>.



## **SCOPO DELLO STUDIO**

Con questo studio si è cercato di definire le caratteristiche cliniche, anamnestiche e laboratoristiche delle pazienti a rischio di invasione microbica della cavità amniotica. In particolare l'attenzione si è rivolta verso la correlazione tra positività della coltura del liquido amniotico e outcome della gravidanza dal punto di vista della salute materna e neonatale. Ulteriori osservazioni microbiologiche sono state eseguite su tamponi vaginali, biopsie placentari e sangue fetale.



## **MATERIALI E METODI**

In questo studio sono state prese in esame donne con gravidanza a termine ( $\geq 37$  settimane gestazionali) e pretermine (da 23 a 36+6 settimane gestazionali) che sono state ricoverate presso l'U.O.C. Clinica Ginecologica e Ostetrica, facente parte del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università degli Studi di Padova nel periodo compreso tra Marzo e Ottobre 2012.

Le pazienti sono state selezionate in base a dati clinici ed anamnestici.

Per le pazienti ricoverate a termine di gravidanza sono stati considerati i seguenti dati: positività al tampone vagino-rettale (eseguito a 35–37 settimane gestazionali), presenza di infezioni urinarie e/o vaginali recidivanti anche dopo terapia, intensa leucorrea e PROM.

Diverso è stato l'approccio con le pazienti ricoverate in epoca gestazionale pretermine, per le quali si è fatto riferimento soprattutto ai fattori di rischio per infezione endoamniotica. Sono state prese in considerazione le pazienti per cui è riscontrata minaccia di parto pretermine, pPROM, perdite ematiche con placenta normoinserita, iperpiressia sine causa e ipercontrattilità uterina.

In totale sono stati raccolti 29 casi, di cui 8 donne con gravidanza pretermine e 21 con gravidanza a termine. Nei casi di parto pretermine, al momento del ricovero sono stati eseguiti tamponi vaginali e cervicali utilizzando provette di tipo eSwab® (Copan Diagnostics Inc.). Per le pazienti ricoverate a termine di gravidanza è stato eseguito il tampone vaginale e rettale.

Per ogni paziente sono stati raccolti 5 campioni:

1. Il liquido amniotico, conservato in un contenitore sterile e riposto in frigorifero alla temperatura di +4°C.
2. Al momento del parto, utilizzando una siringa da 5 ml, è stato raccolto un campione di sangue fetale eseguendo un prelievo dall'arteria ombelicale. Tale campione è stato trasferito all'interno di una provetta da emocoltura pediatrica BacT/ALERT® PF (Biomérieux, Inc.) e riposto in frigorifero a +4°C.
3. Dopo il secondamento, dalla placenta sono state eseguite tre biopsie del lato materno e fetale: parafunicolare, centrale, eccentrica.

Il materiale raccolto è stato, quindi, consegnato al personale dell'U.O. di Microbiologia e Virologia dell'Università degli Studi di Padova per la coltura. La placenta, dopo l'esecuzione dei prelievi, è stata inviata presso l'U.O. di Anatomia Patologica per l'esame istologico.

Il database è stato sviluppato sulla base dei parametri indicati in Tabella I.

Tabella I. Sviluppo del database

<b>PARAMETRI VALUTATI</b>
Età
Nazionalità
PARA
SG all'ingresso
SG al parto
Anamnesi ostetrica
Sierologia
Temperatura
Frequenza cardiaca materna
Frequenza cardiaca fetale
Riscontro di PROM
PCR
WBC count
Tampone vaginale
Urinocoltura
Terapia antibiotica
Tipo di parto
Esame istologico placenta e membrane
Biopsia placentare parafunicolare
Biopsia placentare centrale
Biopsia placentare eccentrica
Esame colturale del liquido amniotico
Esame colturale del sangue fetale
Apgar (1'-5')
Peso del neonato
Ricovero in Patologia Neonatale

## DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA

La diagnostica microbiologica è una diagnostica di tipo eziologico e consente, cioè, di identificare la causa microbica di un'infezione o di una malattia. Lo studio microbiologico ha un importante riscontro nella pratica clinica, poiché fornisce indicazioni per la realizzazione di una terapia mirata. In particolare, in questo studio sono stati eseguiti accertamenti microbiologici per l'identificazione del patogeno sulla base della colorazione di Gram e isolamento in terreno di coltura. Successivamente l'esecuzione dell'antibiogramma ha stabilito il grado di sensibilità e resistenza a sostanze antibiotiche di quel determinato microrganismo.

### 1. MICROSCOPIA

L'osservazione del campione al microscopio ottico è un metodo rapido e semplice da eseguire. Fornisce informazioni sulla specie microbica, la morfologia dei patogeni e la reattività alla colorazione di Gram. Inoltre, identifica la presenza di leucociti e granulociti, indice di risposta infiammatoria all'infezione.

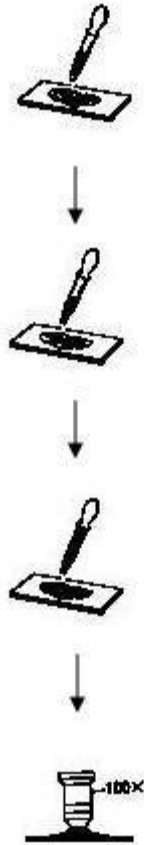
#### 1.1. Colorazione di Gram<sup>25</sup>

Questo tipo di colorazione è detta differenziale. Utilizza due coloranti (primario e secondario), che agiscono in tempi diversi ed evidenziano distintamente le popolazioni batteriche.

Il campione viene inizialmente preparato distendendo uno strato sottile di materiale sul vetrino (si utilizza spesso la tecnica dello striscio) e si procede con la fissazione tramite calore. Viene versato quindi il colorante basico, detto primario (Cristalvioletto), che si lascia agire per 2 – 3 minuti. Successivamente si procede con un lavaggio con liquido di Lugol (una soluzione di iodio e ioduro di potassio), che reagisce con il colorante basico formando un composto liposolubile, che si lascia agire per circa 1 minuto. Il materiale viene lavato con una soluzione decolorante, solitamente alcol etilico e infine con acqua. A questo punto i batteri Gram-positivi assumono colorazione violacea in quanto hanno trattenuto il colorante basico; i batteri Gram-negativi sono grigiastri, poiché la parete cellulare, più sottile rispetto a quella dei Gram -positivi, è stata danneggiata dal successivo lavaggio con alcool. Per distinguere facilmente i due tipi di colonie si utilizza un colorante di contrasto, solitamente safranina, lasciandolo agire per 5–10 minuti. La safranina penetra nelle cellule decolorate e conferisce loro colore rosa o rosso o altre volte

giallastro. Infine si procede con l'osservazione al microscopio ottico (Figura 3).

### Colorazione di Gram



a) Versare sul preparato il cristalvioletto e lasciar agire per circa 2-3 minuti

b) Togliere il colorante in eccesso, senza sciacquare

c) Versare il liquido di Lugol e lasciar agire per 1-2 minuti

d) Decolorare con alcol per circa 30 secondi e lavare con acqua

e) Colorare con la safranina e lasciare agire 5-10 minuti

f) Sciacquare con acqua e asciugare

g) Osservare il preparato colorato al microscopio ottico con un obiettivo ad immersione

Figura 3. Colorazione di Gram



## 2. COLTURA

La coltura microbiologica è una tecnica di moltiplicazione di microorganismi in un determinato medium o terreno di coltura. Tramite la coltura, è possibile determinare il tipo e la quantità di microorganismi presenti in un campione. Può essere effettuata in condizioni di aerobiosi o anaerobiosi. Nel corso dello studio sono stati usati i seguenti terreni di coltura:

### 2.1. Agar Columbia con 5% di sangue di montone (Figura 4)

È un terreno generico altamente nutritivo utilizzato per l'isolamento e la coltura di microrganismi esigenti e non esigenti. Il sangue di montone permette di rilevare le reazioni emolitiche e fornisce il fattore X (eme) necessario per la crescita di numerose specie patogene. L'incubazione è effettuata a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  per 18 – 72 h in atmosfera aerobica con aggiunta di anidride carbonica. Utilizzando questa coltura, si identificano più spesso colonie di: Streptococchi (non gruppo D), Enterococchi (non gruppo D), Stafilococchi, Corinebatteri, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacteriaceae*, *Candida*.



Figura 4. Agar Columbia con 5% di sangue di montone

## 2.2. Terreno di coltura CHROMagar Candida (Figura 5)

È un terreno di coltura selettivo e differenziale per l'isolamento di funghi appartenenti al genere *Candida*, quali *C. Albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Arricchito con substrati cromogeni, permette una rapida distinzione delle diverse specie sulla base del colore assunto dalle colonie. Tali substrati artificiali, rilasciano composti di colore diverso a seconda della degradazione di enzimi specifici. Ciò consente di differenziare determinate specie o di rilevare alcuni gruppi di organismi mediante semplici test di conferma. L'incubazione è effettuata a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  per 20 – 48 h al buio in atmosfera aerobica.



Figura 5. CHROMagar Candida

## 2.3. Agar cioccolato (Figura 6)

È un terreno non selettivo per l'isolamento e la coltura di microrganismi esigenti e non esigenti, in particolare *Neisseria* e *Haemophilus* species. Il sangue di cavallo riscaldato presente in questo terreno, fornisce il fattore X (eme) e il fattore V (NAD), indispensabile per lo sviluppo, ad esempio, di *H. influenzae*. L'utilizzo di Agar cioccolato è indicato per l'isolamento di batteri che potrebbero non crescere sui terreni Agar sangue utilizzati abitualmente, soprattutto per esigenze nutritive. Il terreno viene incubato in atmosfera aerobica con aggiunta di anidride carbonica a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  per 18 – 24 ore.

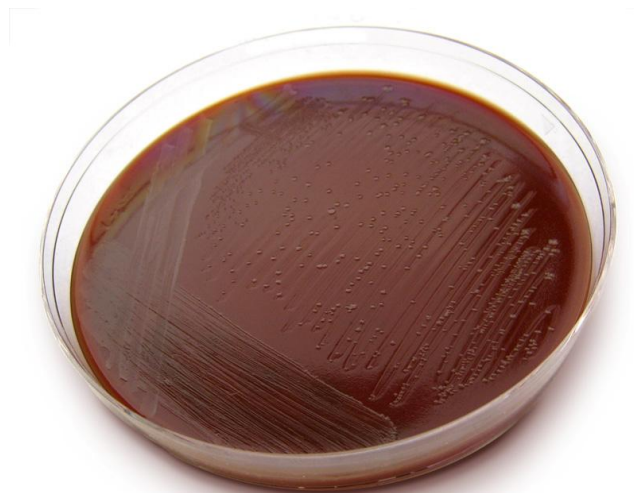


Figura 6. Agar cioccolato

#### 2.4. Agar MacConkey (Figura 7)

È un terreno differenziale e selettivo per l'isolamento e la differenziazione di *Enterobacteriaceae* e molteplici altri bacilli Gram-negativi, quali *E. Coli*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*. Agar MacConkey è arricchito con lattosio e rosso neutro. La distinzione delle colonie è basata sulla capacità di fermentare il lattosio da parte dei microorganismi. I batteri che fermentano il lattosio presentano una colorazione tendente al rosso. Per inibire la crescita dei batteri Gram-positivi, nel terreno è presente cristalvioletto. Per quanto riguarda la procedura del test, le piastre sono incubate schermate dalla luce a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  per 18 – 24 ore o più a lungo, se necessario.



Figura 7. Agar MacConkey

### 3. ANTIBIOGRAMMA

L'antibiogramma è un test che permette la valutazione del profilo di sensibilità batterica in vitro a vari antibiotici; si esegue esponendo concentrazioni standard del microrganismo in esame a concentrazioni definite di farmaci. Nel corso di questo studio tale test è stato eseguito utilizzando un sistema detto VITEK.

Questo metodo consente di eseguire l'antibiogramma in completa automazione, riducendo le operazioni manuali alla sola preparazione della sospensione batterica da analizzare. Utilizza un supporto a 30 o 45 pozzetti, detto card, in cui avvengono reazioni di spettrometrie di massa per identificare le specie microbiche presenti e realizzare l'antibiogramma. I risultati delle prove sono espressi in MIC (Minima Concentrazione Inibente), intesa come la più bassa concentrazione del farmaco in grado di inibire la crescita del microrganismo saggiato. I dati vengono quindi confrontati con i valori soglia (breakpoint) indicati secondo il metodo di riferimento europeo: EUCAST. Sulla base dei breakpoint, i risultati ottenuti nelle cosiddette categorie d'interpretazione: sensibile (S), resistente (R).

## RISULTATI

Sono state prese in esame 29 pazienti, di cui 8 pretermine e 21 a termine di gravidanza, le cui caratteristiche sono indicate in Tabella II e Tabella III.

Tabella II. Statistiche descrittive

	<b>Minimo</b>	<b>Massimo</b>	<b>Media</b>	<b>Deviazione standard</b>
<b>Età</b>	21	47	31.45	6.822
<b>SG all'ingresso</b>	16,1	41,5	36.086	6.658
<b>SG al parto</b>	21,5	41,5	36.593	5.690

Tabella III. Nazionalità, parità, anamnesi ostetrica, PROM

		<b>Frequenza</b>	<b>Percentuale</b>
<b>Nazionalità</b>	Italiana	10	34.5
	Straniera	19	65.5
<b>Parità</b>	Nullipara	19	65.5
	Pluripara	10	34.5
<b>PROM</b>	No	24	82.8
	Si pretermine (pPROM)	4	13.8
	Si a termine	1	3.4
<b>Anamnesi ostetrica</b>	Negativa	26	89.7
	MPP, PROM, PP	3	10.3

Si osserva dalla tabella III, che il 65.5% del campione comprende donne straniere, rispetto al 34.5% di donne italiane. Per quanto riguarda la parità, 19 donne erano nullipare e 10 pluripare. Nel 17.2% dei casi è stata riscontrata rottura prematura delle membrane; in particolare, 4 casi su 5 tale riscontro riguarda pazienti pretermine. L'anamnesi ostetrica per MPP, PROM e parto pretermine risulta positiva solamente in tre casi.

Tabella IV. Parametri materni e fetali

		<b>Frequenza</b>	<b>Percentuale</b>
<b>Frequenza cardiaca materna</b>	≤ 110 bpm	29	100
	> 110 bpm	0	0
<b>Frequenza cardiaca fetale</b>	≤ 160 bpm	28	96.6
	> 160 bpm	1	3.4
<b>Temperatura materna</b>	≤ 38°C	25	86.2
	> 38°C	4	13.8
<b>PCR</b>	≤ 5 mg/L	26	89.7
	> 5 mg/L	3	10.3
<b>WBC count</b>	≤ 15000 x 10 <sup>9</sup> /L	28	96.6
	> 15000 x 10 <sup>9</sup> /L	1	3.4
<b>Urinocoltura</b>	Negativa	27	93.1
	Positiva	2	6.9
<b>Terapia antibiotica</b>	Non eseguita	5	17.2
	In travaglio	18	62.1
	In gravidanza	6	20.7
<b>Tipo di terapia</b>	Non eseguita	6	20.7
	Ampicillina	22	75.9
	Clindamicina	1	3.4

In Tabella IV sono indicate le frequenze dei parametri materni e fetali considerati nello studio.

In nessuna paziente è stata riscontrata tachicardia (>110 bpm), mentre è stato identificato un singolo caso di tachicardia fetale (>160 bpm).

In quattro pazienti è stato riscontrato un rialzo della temperatura oltre i 38°C. La PCR sierica materna è risultata negativa nell'89.7% dei casi così come la conta dei globuli bianchi (negativa nel 96.6% dei casi).

L'urinocoltura è risultata positiva in due casi, in cui è stato successivamente isolato Escherichia Coli. Entrambi i casi sono a termine di gravidanza. Si specifica che in questi casi eseguito era un tampone vagino-rettale è risultato positivo a Streptococco di Gruppo B, la coltura di liquido amniotico positiva per Escherichia Coli, e biopsie placentari, sangue fetale ed esame istologico della placenta negativi.

Al 62.1% delle pazienti è stata somministrata la terapia antibiotica in travaglio (Ampicillina in 22 casi, Clindamicina in 1 caso per allergia a penicillina). Sei donne hanno seguito la stessa terapia anche in gravidanza.

Nei grafici 2a, 2b, 2c e 2d sono indicate le percentuali di frequenza dei microorganismi isolati in tampone vaginale e cervicale, vaginale e rettale, liquido amniotico, biopsie placentari e sangue fetale. Il microorganismo più frequentemente isolato nel tampone vaginale è lo Streptococco di Gruppo B (44.9%). Nel liquido amniotico (17.2%), biopsie placentari (13.8%) e sangue fetale (6.9%) si riscontra con maggiore frequenza Escherichia Coli. Gli altri microorganismi hanno una frequenza pari a circa il 3 – 7%.

Grafico 2a. Microorganismi individuati nel tampone vaginale e cervicale, vaginale e rettale

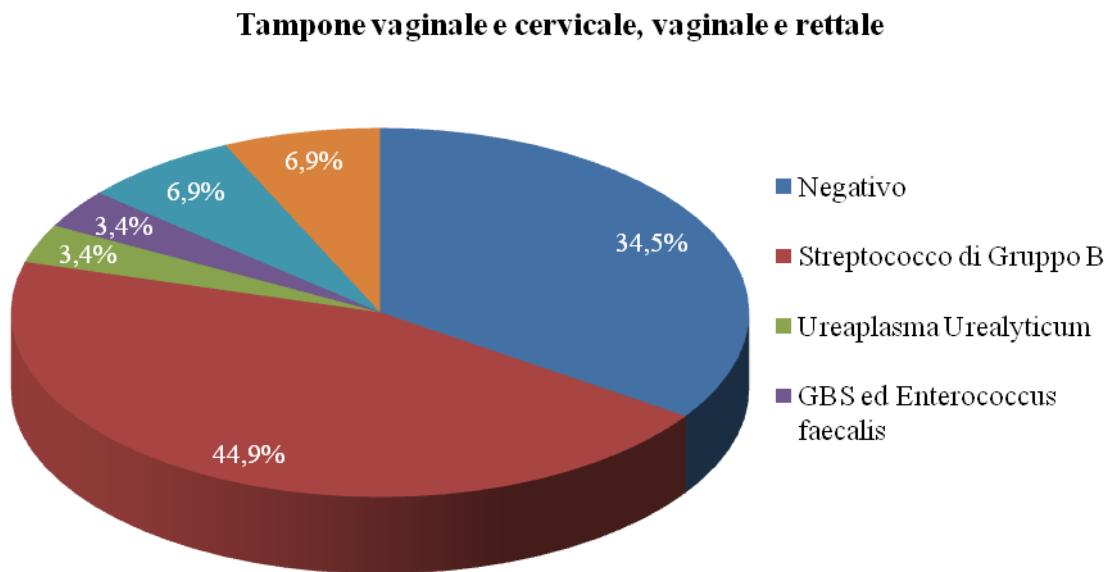


Grafico 2b. Microorganismi individuati nel liquido amniotico

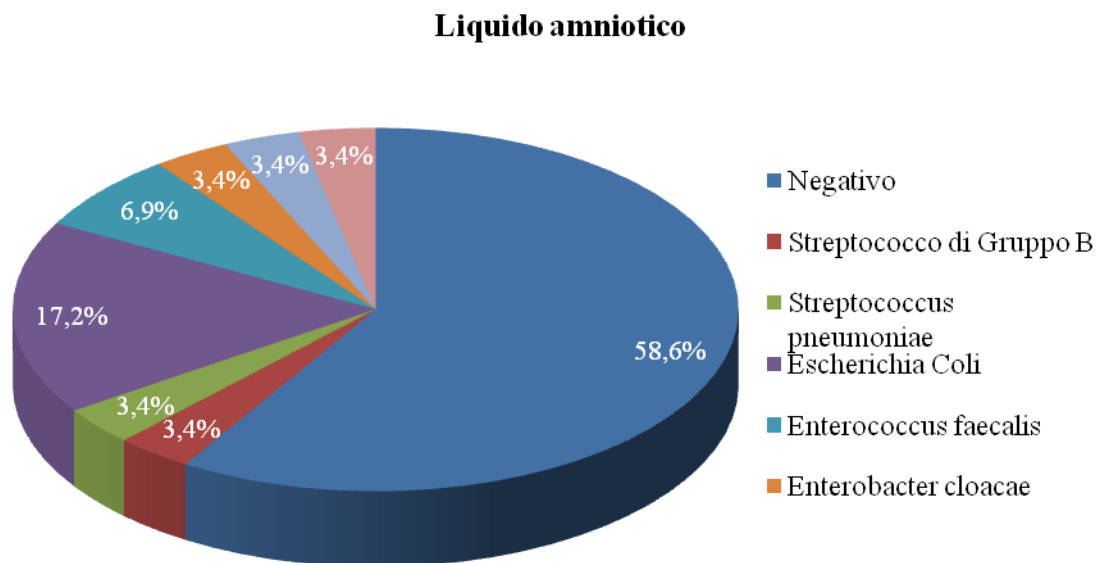


Grafico 2c. Microorganismi individuati nelle biopsie placentari

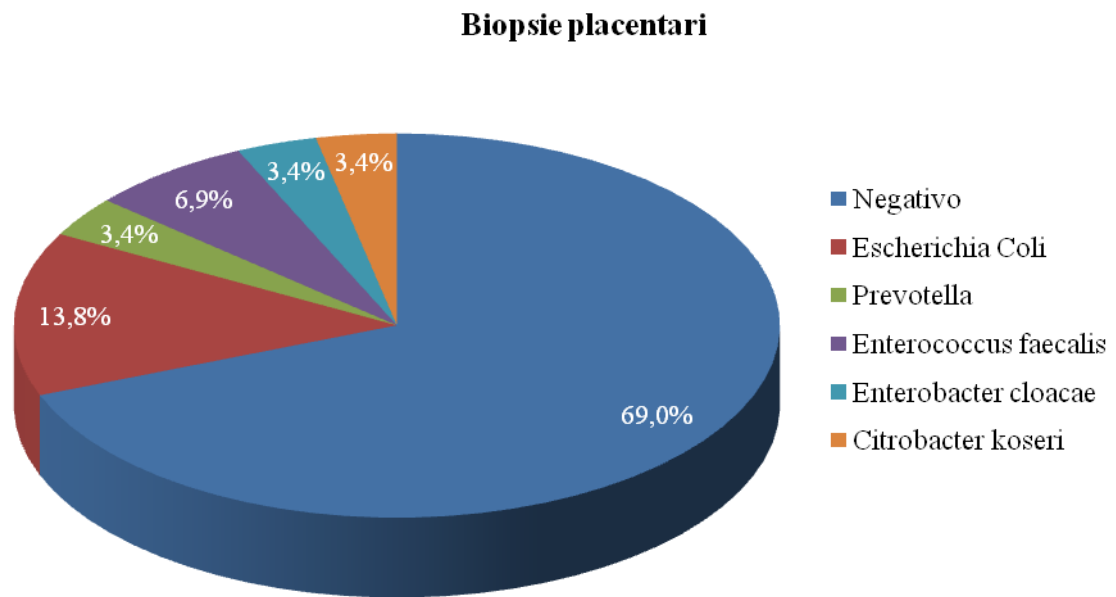
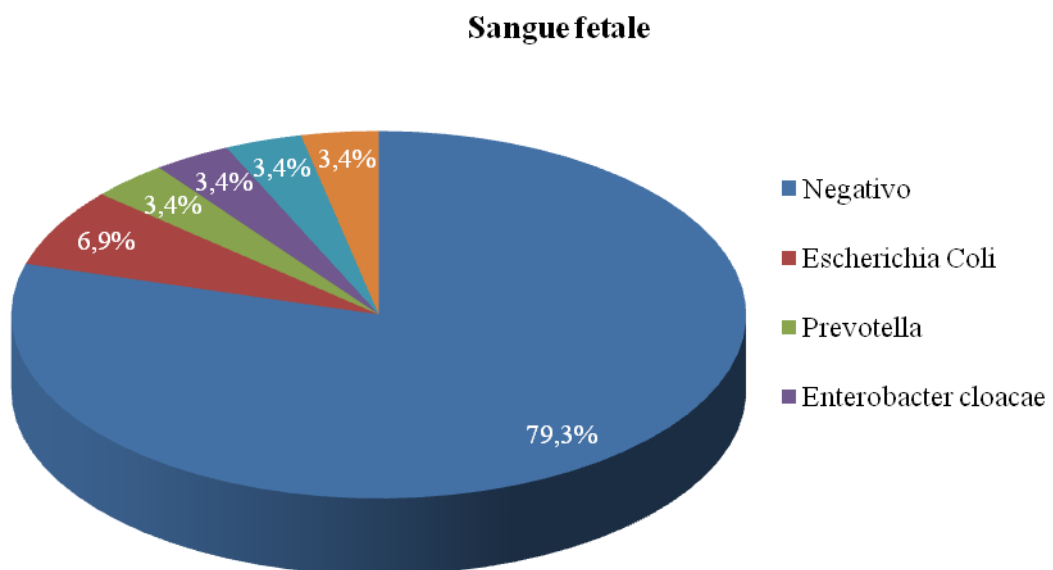


Grafico 2d. Microorganismi individuati nel sangue fetale





Nei casi di parto pretermine (N=8, media=28.73 ± 5.30 SG) il tampone vaginale e cervicale è risultato positivo in 1 caso per Streptococco di Gruppo B; la coltura di liquido amniotico è risultata positiva per: Streptococcus pneumoniae in 1 caso, Escherichia Coli in 2 casi, Citrobacter koseri in 1 caso; la coltura di biopsie placentari parafunicolari, centrali ed eccentriche è risultata positiva per: Escherichia Coli in 2 casi, Prevotella in 1 caso, Enterococcus faecalis in 1 caso; la coltura di sangue fetale è risultata positiva per: Escherichia Coli in 1 caso, Prevotella in 1 caso, Staphylococcus haemolyticus in 1 caso (Tabella V).

Tabella V. Colture microbiologiche ed esame istologico placentare nei casi di parto pretermine

Età gestazionale	TVC	Liquido amniotico	Biopsia parafunicolare	Biopsia centrale	Biopsia eccentrica	Sangue fetale	Esame istologico placentare
21.5	Negativo	E. Coli	E. Coli	E. Coli	E. Coli	S. haemolyticus	Flogosi
23	Negativo	E. Coli	E. Coli	E. Coli	E. Coli	E. Coli	Corioamnionite
24	Negativo	Prevotella	Prevotella	Prevotella	Prevotella	Prevotella	Corioamnionite
29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
30	Negativo	S. pneumoniae	E. faecalis	E. faecalis	E. faecalis	Negativo	Flogosi
33.4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34.4	GBS	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34.5	Negativo	Citrobacter koseri	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

La coltura di liquido amniotico si è dimostrata essere più sensibile rispetto al tampone vaginale e cervicale nell'identificare un'invasione microbica della cavità amniotica. In cinque casi su otto di positività di coltura di liquido amniotico, non è corrisposta una positività del tampone vaginale e cervicale, e nell'unico caso in cui il tampone vaginale e cervicale è riscontrato positivo per Streptococco di Gruppo B la coltura di liquido amniotico è risultata negativa. Ciò probabilmente è dovuto al fatto che la donna era stata efficacemente trattata farmacologicamente in gravidanza.

Dal confronto tra coltura di liquido amniotico e coltura di biopsie placentari è emersa corrispondenza in sei casi su otto. Nello specifico, in tre casi sia la coltura di liquido amniotico che la coltura di biopsie placentari è risultata negativa, e in altri tre casi è stato identificato lo stesso microorganismo. In un solo caso il microorganismo identificato è differente: in particolare, nel liquido amniotico è stato riscontrato Streptococcus pneumoniae e nella coltura di biopsie placentari è stato isolato Enterococcus faecalis. La non concordanza è da attribuire al fatto che in questo caso il campione di liquido amniotico è stato raccolto a 24 settimane gestazionali e 5 giorni

quando è stata riscontrata pPROM, mentre il parto è avvenuto a 30 settimane gestazionali. Nel periodo di latenza di 5 settimane la paziente è stata sottoposta a terapia antibiotica. Nonostante le due colture di liquido amniotico e biopsie placentari siano pressoché sovrapponibili, in un caso la coltura di liquido amniotico ha isolato *Citrobacter koseri*, microorganismo appartenente alla famiglia degli Enterobacteriaceae, mentre la coltura delle biopsie placentari è risultata negativa. Ciò avvalorata la teoria che la coltura di liquido amniotico risulti essere più sensibile nell'individuare un'invasione microbica della cavità amniotica anche rispetto alle biopsie placentari.

Considerando la coltura di sangue fetale, è emersa corrispondenza con la coltura del liquido amniotico in due casi su otto per *Escherichia Coli* e *Prevotella*.

Nel caso in cui è stato isolato *Escherichia Coli*, la paziente, che era stata ricoverata a 23 settimane gestazionali per pPROM, ha sviluppato un'embolia polmonare da liquido amniotico, segni clinici di corioamnionite. L'emocoltura della paziente risultò positiva per *Escherichia Coli*. Il neonato ha sviluppato enterocolite necrotizzante e emorragia intraventricolare di secondo grado. Ciò suggerisce che la coltura di sangue fetale positiva per *Escherichia Coli* possa essere indicativa dello stato neonatale e contribuire a una diagnosi di infezione neonatale.

Nel caso in cui dalla coltura di liquido amniotico e di sangue fetale è stata isolata la *Prevotella*, la madre ha sviluppato iperpiressia in puerperio non avvalorata da emocoltura.

In un caso di aborto a 21 settimane e 5 giorni in paziente con due pregressi cerchiaggi cervicali la coltura di liquido amniotico è risultata positiva per *Escherichia Coli* e nel sangue fetale è stato isolato *Staphylococcus haemolyticus*. La non corrispondenza tra le due colture probabilmente è dovuta a una sovra infezione dovuta al fatto che il feto è nato morto. In altri tre casi è stata corrispondenza tra le due colture per quanto riguarda la negatività. In altri due casi in cui la coltura di liquido amniotico è risultata positiva per *Streptococcus pneumoniae* e *Citrobacter koseri*, nel sangue fetale non è stato isolato alcun patogeno. Ciò avvalorata la teoria che la coltura di liquido amniotico sia più sensibile nell'individuare un'invasione microbica della cavità amniotica non solo rispetto al tampone vaginale e cervicale e alla coltura di biopsie placentari, ma anche rispetto al sangue fetale.

Infine, considerando che attualmente l'esame istologico risulta essere lo standard diagnostico per corioamnionite, dal confronto con la coltura di liquido amniotico è emersa una corrispondenza in sette casi su otto. Nello specifico, quando nel liquido

amniotico sono stati isolati *Escherichia Coli* e *Prevotella*, in un caso di positività per *Escherichia Coli* è stata riscontrata corioamnionite istologica, così come nel caso di positività della coltura del liquido amniotico per *Prevotella*. In altri due casi con l'esame istologico è stata diagnostica una flogosi aspecifica. In un caso nel liquido amniotico è stato isolato *Escherichia Coli* e il feto è nato morto a 21 settimane e 5 giorni. In un caso è stato isolato *Streptococcus pneumoniae* a 24 settimane e 5 giorni. Si è verificata concordanza anche per quanto riguarda la negatività. In tre casi di coltura di liquido amniotico negativa l'esame istologico è risultato negativo. In un solo caso l'esame istologico non conferma la diagnosi microbiologica su coltura di liquido amniotico, che aveva isolato *Citrobacter koseri*. Da ciò deduciamo che la coltura di liquido amniotico si è rivelata sensibile nell'identificare invasione microbica della cavità amniotica. La non corrispondenza con l'esame istologico è dovuta probabilmente al fatto che la coltura di liquido amniotico identifica la carica batterica, ma non è nota la carica batterica minima tale da indurre lo sviluppo di corioamnionite.

Nei casi di parto a termine (N=21, media=39.59 ± 1.14 SG) il tampone vagino-rettale è risultato positivo in 12 casi per Streptococco di Gruppo B, per Streptococco di Gruppo B ed U. Urealyticum in 2 casi, per Streptococco di Gruppo B ed Enterococcus faecalis in 1 caso; il tampone vaginale è risultato positivo ad Ureaplasma Urealyticum in 1 caso, per Candida in 2 casi; la coltura di liquido amniotico è risultata positiva in 4 casi per Escherichia Coli, in 2 casi per Enterococcus faecalis, in 1 caso per Streptococco di Gruppo B, in 1 caso per Enterobacter cloacae, in 1 caso per Bacteroides fragilis. La coltura di biopsie placentari parafunicolari è risultata positiva per Escherichia Coli in 2 casi e per Enterococcus faecalis in 1 caso. La coltura di biopsie centrali è risultata positiva per Escherichia Coli in 2 casi, per Citrobacter koseri in 1 caso e per Enterobacter cloacae in 1 caso. La coltura di biopsie eccentriche è risultata positiva per Enterobacter cloacae in 1 caso. La coltura di sangue fetale è risultata positiva per Enterobacter cloacae in 1 caso, per Escherichia Coli in 1 caso e per Staphylococcus haepidermidis in 1 caso (Tabella V).

Tabella V. Colture microbiologiche ed esame istologico placentare nei casi di parto a termine

<b>Età gestazionale</b>	<b>TV e TVR</b>	<b>Liquido amniotico</b>	<b>Biopsia parafunicolare</b>	<b>Biopsia centrale</b>	<b>Biopsia eccentrica</b>	<b>Sangue fetale</b>	<b>Esame istologico placentare</b>
37.4	Negativo	E. Coli	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
38	GBS	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
38	GBS	E. cloacae	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
38.1	GBS	E. Coli	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
38.4	GBS	E. Coli	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
38.5	GBS	GBS	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
39	GBS	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
39.4	GBS	Negativo	Negativo	C. koseri	Negativo	Negativo	Negativo
39.4	GBS+U. Urealyticum	Negativo	Negativo	E. cloacae	E. cloacae	E. cloacae	Negativo
39.6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40	Candida	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Flogosi
40.1	GBS	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	S. haepidermidis	Negativo
40.3	U. Urealyticum	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40.3	Negativo	E. faecalis	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40.3	GBS	B. fragilis	E. Coli	E. Coli	Negativo	Negativo	Negativo
40.4	GBS	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40.5	GBS+E.faecalis	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40.6	GBS+U. Urealyticum	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	E. Coli	Negativo
40.6	Candida	E. Coli	E. Coli	E. Coli	Negativo	Negativo	Negativo
41	GBS	E. Coli	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41.5	GBS	E. faecalis	E. faecalis	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Confrontando la coltura di liquido amniotico con il tampone vaginale e con il tampone vagino-rettale, si riscontra che la coltura di liquido amniotico ha isolato su ventuno casi: Streptococco di Gruppo B in un caso, Enterobacter cloacae in un caso, Enterococcus faecalis in due casi, Escherichia Coli in cinque casi, Bacteroides fragilis in un caso. Considerando che il tampone vaginale e rettale eseguito presso il termine di gravidanza ricerca specificatamente lo Streptococco di Gruppo B, e che il tampone vaginale ricerca anche altri microorganismi, la coltura di liquido amniotico risulta essere più sensibile rispetto a quest'altre metodiche nell'identificare un'invasione microbica della cavità amniotica, in quanto la corrispondenza tra i due tipi di tampone e la coltura di liquido amniotico è risultata tale solo in un caso in cui nel tampone vagino-rettale è stato isolato Streptococco di Gruppo B e nel liquido amniotico è stato isolato lo stesso microorganismo. Negli altri nove casi di positività della coltura di liquido amniotico non è stata ritrovata alcuna corrispondenza nel tampone vaginale e vagino-rettale per lo stesso microorganismo.

Nei casi in cui la coltura liquido amniotico è risultata essere negativa, nel tampone vaginale e vagino-rettale sono stati isolati: Streptococco di Gruppo B in cinque casi, Streptococco di Gruppo B ed Ureaplasma Urealyticum in due casi, Candida in un caso, Ureaplasma Urealyticum in un caso, Enterococcus faecalis in un caso. La non corrispondenza tra le due metodiche sia nei casi di positività che in quelli di negatività può essere giustificata dal fatto che tra la diagnosi eseguita con il tampone e il momento del parto intercorrono in media quattro o cinque settimane, durante le quali a seguito di terapia antibiotica la paziente si negativizza per quel microorganismo o, viceversa, si positivizza per microorganismi differenti.

Dal confronto tra coltura di liquido amniotico e coltura di biopsie placentari risulta corrispondenza in dieci casi su ventuno: in nove casi sia la coltura di liquido amniotico che quella delle biopsie placentari è risultata negativa, in un caso nel liquido amniotico e nella biopsia placentare parafunicolare è stato isolato Enterococcus faecalis e in un caso nel liquido amniotico e nelle biopsie placentari parafunicolare e centrale è stato isolato Escherichia Coli. In un caso sono stati isolati microorganismi differenti: nel liquido amniotico è stato isolato Bacteroides fragilis, e nelle biopsie placentari parafunicolare e centrale è stato isolato Escherichia Coli. In due casi in cui la coltura di liquido amniotico è risultata essere negativa, nelle biopsie placentari sono stati isolati in un caso Citrobacter koseri (biopsia centrale) e in un caso Enterobacter cloacae (biopsia centrale ed eccentrica). La diversità di microorganismi identificati può essere legata alla

capacità o meno di un microorganismo di invadere la cavità amniotica infettando il letto placentare e il liquido amniotico rispetto ad un altro. La non corrispondenza tra le positività delle due diverse colture è legata in primis al fatto che la metodica delle biopsie placentari ha un alto bias legato alla zona in cui è eseguito il prelievo e alla quantità di tessuto prelevato e anche perché il meccanismo di patogenesi di infezione corioamniotica prevede l'infezione del liquido amniotico a partire dal letto placentare e non viceversa.

Considerando la coltura di sangue fetale, vi è corrispondenza con la coltura di liquido amniotico in otto casi su ventuno, in cui entrambe le colture sono risultate negative. In tre casi la coltura di sangue fetale è risultata positiva per *Enterobacter cloacae* in un caso e per *Escherichia Coli* in un caso, mentre la coltura di liquido amniotico è risultata negativa. Ciò può essere giustificato dalla patogenesi dell'infezione endoamniotica, in cui il microorganismo invade prima i vasi fetali e poi passa nel liquido amniotico. Il caso di positività della coltura di sangue fetale a *Staphylococcus epidermidis* in presenza di coltura di liquido amniotico negativa può essere dovuta a una contaminazione del campione al momento del prelievo in quanto tale microorganismo è commensale della cute.

Nei casi di parto a termine il sangue fetale non si rivela significativo per quanto riguarda lo stato neonatale.

Confrontando coltura di liquido amniotico ed esame istologico placentare risulta corrispondenza in dieci casi su ventuno, in cui entrambi i test risultano essere negativi. In un solo caso all'esame istologico è stata identificata flogosi aspecifica in una paziente con coltura di liquido amniotico negativa. In questo caso la paziente aveva un tampone vaginale positivo per *Candida*. La presenza di tale micete può aver indotto una flogosi a livello placentare, ma tale teoria in letteratura è dimostrata solo in pochi casi. Nei rimanenti dieci casi in cui non è stata riscontrata corrispondenza tra la coltura di liquido amniotico e l'esame istologico della placenta, tale discrepanza si può giustificare avanzando la teoria che la carica microbica presente al parto non era tale da innescare un processo infettivo, anche se attualmente con la coltura di liquido non è possibile definire la carica microbica minima per lo sviluppo di corioamnionite.

Anche per quanto riguarda i parti a termine la coltura di liquido amniotico risulta essere la più sensibile metodica nell'individuare un'invasione microbica della cavità amniotica rispetto alle altre considerate nello studio.

## DISCUSSIONE

Il *gold standard* diagnostico per invasione microbica della cavità amniotica è l'esame colturale del liquido amniotico<sup>29</sup>. L'utilizzo di tale metodica all'interno di questo studio ha confermato quanto indicato in letteratura. In particolare, nei casi di parto pretermine si è riscontrata positività alla coltura di liquido amniotico nel 62.5% dei casi (5 casi su 8) e nei casi di parto a termine il liquido amniotico è risultato positivo a coltura nel 47.6% dei casi (10 casi su 21).

Confrontando la coltura di liquido amniotico con la coltura di tampone vaginale, biopsie placentari e sangue fetale è risultato che sia per quanto riguarda i parti pretermine che per quanto riguarda i parti a termine la coltura di liquido amniotico risulta essere più sensibile rispetto alle altre.

Se si prendono in esame i tamponi vaginale, vaginale e cervicale, vaginale e rettale, non vi è stata concordanza con le colture di liquido amniotico.

In uno studio del 2007 eseguito su un campione di 49 donne che hanno partorito prima del termine di cui 20 con coltura di liquido amniotico positiva, non è stata identificata alcuna correlazione tra coltura di liquido amniotico e tampone vaginale per quanto riguarda l'identificazione di un'invasione microbica della cavità amniotica<sup>32</sup>.

Nelle pazienti che hanno partorito pretermine, infatti, a un tampone vaginale e cervicale negativo è corrisposta una coltura di liquido amniotico positiva nel 62.5% dei casi.

In un caso in cui non vi è stata tale corrispondenza con un tampone vaginale positivo per Streptococco di Gruppo B la negatività della coltura di liquido amniotico è legata alla terapia antibiotica con ampicillina eseguita dalla paziente, efficace nell'eradicazione di tale microorganismo.

Nei casi di parto a termine, la non corrispondenza tra le due colture è dovuta essenzialmente al tempo intercorso tra l'esecuzione del tampone vaginale e l'espletamento del parto (fino anche a cinque settimane prima del parto).

Per quanto riguarda l'utilizzo della coltura di biopsie placentari, in letteratura non si trovano riscontri significativi riguardo a questa tecnica come una tecnica che definisce un'invasione microbica della cavità amniotica. Anche in questo studio si può confermare questa tesi. Stando ai risultati ottenuti e considerando la patogenesi dell'infezione endoamniotica, questa metodica può essere utile nell'avvalorare una diagnosi di corioamnionite clinica già confermata dalla coltura del liquido amniotico e dall'esame istologico della placenta. Una limitazione della coltura di biopsie placentari

è soprattutto legata al momento del prelievo e all'area placentare sezionata.

Per la prima volta in questo studio è stato sottoposto a coltura un altro distretto, ossia il sangue fetale. Da quanto emerge, nei casi di corioamnionite la positività alla coltura del sangue fetale risulta essere un indicatore dello stato neonatale, anche se ancora non risulta essere un parametro affidabile, visto l'alto numero di falsi negativi. Infatti in sei casi di coltura di sangue fetale positivo, soltanto in due neonati è stata riscontrata malattia neonatale da sepsi.

Se si prendono in considerazione i casi pretermine di questo studio, su 8 casi è stata fatta diagnosi di corioamnionite istologica in 4 casi, di cui 2 presentano una corioamnionite di tipo clinico. Di questi ultimi 2 (a 23 e a 24 settimane gestazionali) è stato possibile rilevare coltura positiva di liquido amniotico e delle biopsie placentari concordanti per lo stesso patogeno: *Escherichia Coli* e *Prevotella*. Tale dato indica l'affidabilità della coltura del liquido amniotico, e da essa associata quella delle biopsie placentari nell'individuare le pazienti con corioamnionite o a rischio di essa. In questi 2 casi altro elemento importante e nuovo è stata la coltura positiva del sangue fetale concordante con gli altri due tipi di coltura e con lo stato di sepsi alla nascita dei due neonati.

Per quanto riguarda gli altri 2 casi pretermine con la sola diagnosi istologica di corioamnionite: il primo trattava di una paziente a 21 settimane gestazionali e 5 giorni con coltura di liquido amniotico e biopsie placentari positiva (e quindi indicanti la flogosi) per lo stesso microorganismo. L'unica coltura che si discosta è quella del sangue fetale, positivo ma per un germe diverso, forse dovuta a una sovra infezione su un feto già morto.

Il secondo riguardava una donna con diagnosi di pPROM a 24 settimane gestazionali e 5 giorni e coltura del liquido amniotico positiva per *Streptococcus pneumoniae*, successivamente trattato con terapia antibiotica tanto da permettere una prosecuzione della gravidanza fino a 30 settimane gestazionali. Le colture placentari indicano un secondo germe patogeno e non è stato eseguito un ulteriore prelievo dal liquido amniotico: sono intercorse troppe settimane fra il prelievo del liquido e quello delle placenti.

In tutti i casi i tamponi vaginali e cervicali risultavano negativi.

Per i casi a termine di gravidanza non è stata nessuna corioamnionite clinica né istologica.

Su 21 pazienti le colture di liquido amniotico sono risultate positive, ma non vi è stata



correlazione con i tamponi vaginali o vagino-rettali, in quanto forse eseguiti in settimane troppo lontane dal parto, né è stata riscontrata concordanza con le biopsie placentari, per la maggior parte negativa, né con il sangue fetale. Questo forse a dimostrazione della sensibilità del test a rilevare l'infezione endoamniotica, ma non ancora in grado di correlare la carica batterica e il grado di flogosi da essa determinata. Sulla base della letteratura, nei casi di parto pretermine con positività del liquido amniotico alla coltura, nel 54.4% delle pazienti è riscontrata corioamnionite istologica<sup>33</sup> e nei casi di parto a termine tale corrispondenza è pari all'11.5% dei casi<sup>34</sup>. In questo studio tali dati sono confermati e in due casi di corioamnionite oltre alla positività della coltura del liquido amniotico e dell'istologia placentare, le pazienti hanno manifestato segni clinici.

Per quanto riguarda lo studio eseguito, una limitazione è data dal basso di numero di soggetti campionati. Ci si augura di poter proseguire nella ricerca in modo da arrivare a conclusioni sempre più affidabili e complete.



## CONCLUSIONI

La coltura del liquido amniotico risulta essere una metodica affidabile e altamente sensibile nell'identificare un'invasione microbica della cavità amniotica e per il clinico può rappresentare uno strumento per poter condurre un buon *management* nei casi a rischio di sviluppo di una corioamnionite. Attualmente occorre proseguire gli studi soprattutto per quanto riguarda la sensibilità del test nell'individuare la carica microbica minima che innesca il meccanismo patogenetico d'infezione endoamniotica per garantire poi alla madre e al neonato un trattamento mirato ed efficace.

Ulteriori approfondimenti meritano le colture di biopsie placentari e del sangue fetale.



**BIBLIOGRAFIA**

1. Hui-Chung W, Chung-Min S, Yih-Yiing W, Yeong-Seng Y, Ka-Em K: Subclinical Histologic Chorioamnionitis and Related Clinical and Laboratory Parameters in Preterm Deliveries. *Pediatrics & Neonatology* 2009; 50(5): 217–221
2. Tita ATN, Andrews WW: Diagnosis and Management of Clinical Chorioamnionitis. *Clinics in Perinatology* 2010; 37(2): 339-354
3. Hermansen MC, Hermansen MG: Perinatal Infection and Cerebral Palsy. *Clinics in Perinatology* 2006; 33: 315-333
4. Fahey JO: Clinical Management of Intra-Amniotic Infection and Chorioamnionitis: A Review of the Literature. *Journal of Midwifery & Women's Health* 2008; 53: 227-235
5. Lahra MM, Beeby PJ, Jeffery HE: Intrauterine Inflammation, Neonatal Sepsis, and Chronic Lung Disease: A 13-Year Hospital Cohort Study. *Pediatrics* 2009; 123; 1314
6. Choi SJ, Park SD, Jang H, Uh Y, Lee A: The Prevalence of Vaginal Microorganisms in Pregnant Women with Preterm Labor and Preterm Birth. *Annals of Laboratory Medicine* 2012;32:194-200
7. Kessous R, Weintraub AY, Sergienko R, Lazer T, Press F, Wiznitzer A, Sheiner E: Bacteruria with group-B streptococcus: is it a risk factor for adverse pregnancy outcomes? *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 2012; 25(10): 1983–1986
8. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW: Intrauterine Infection and Preterm Delivery. *The New England Journal of Medicine* 2000; 342(20): 1500-1507
9. Goncalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R: Intrauterine Infection and Prematurity. *MRDD Research Reviews* 2002; 8: 3-13

10. Centers for Disease Control and Prevention: Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease Revised Guidelines from CDC. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2010; 59(10): 1-36
11. Royal College of Obstetricians and Gynecologists: Prevention of early onset neonatal group b Streptococcal disease. RCOG Guideline No.36 2003
12. Namba F, Hasegawa T, Nakayama M, Hamanaka T, Yamashita T, Nakahira K, Kimoto A, Nozaki M, Nishihara M, Mimura K, Yamada K, Kitajima H, Suehara N, Yanagihara I: Placental Features of Chorioamnionitis Colonized With Ureaplasma Species in Preterm Delivery. *Pediatric Research* 2010; 67(2): 166-172
13. Lavigne J-P, Boutet-Dubois A, Laouini D, Combescure C, Bouziges N, Marès P, Sotto A. Virulence Potential of Escherichia coli Strains Causing Asymptomatic Bacteriuria during Pregnancy. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49(11): 3950-3953
14. Fishman SG, Gelber SE: Evidence for the clinical management of chorioamnionitis. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2012; 17: 46-50
15. Kovo M, Schreiber L, Ben-Haroush A, Shor S, Golan A, Bar J: Intrapartum fever at term: clinical characteristics and placental pathology. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 2012; 25(8): 1273–1277
16. Kordek A, Torbè A, Podraza W, Loniewska B, Jursa-Kulesza J, Rudnicki J. Does prenatal antibiotic therapy compromise the diagnosis of early-onset infection and management of the neonate?. *Journal of Perinatal Medicine* 2011; 39: 337-342

17. DiGiulio DB, Romero R, Kusanovic JP, Gómez R, Kim CJ, Seok KS, Gotsch F, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Sanders K, Bik EM, Chaiworapongsa T, Oyarzun E, Relman DA. Prevalence and Diversity of Microbes in the Amniotic Fluid, the Fetal Inflammatory Response, and Pregnancy Outcome in Women with Preterm Pre-Labor Rupture of Membranes. *American Journal of Reproductive Immunology* 2010; 64: 38-57
18. Buhimschi IA, Buhimschi CS. Proteomics/diagnosis of chorioamnionitis and of relationship with the fetal exposome. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2012; 17: 36-45
19. Cobo T, Kacerovsky M, Palacio M, Hornychova H, Hougaard DM, Skogstrand K, Jacobsson B. Intra-Amniotic Inflammatory Response in Subgroups of Women with Preterm Prelabor Rupture of the Membranes. *PloS ONE* 2012; 7(8): e43677
20. Trochez-Martinez RD, Smith P, Lamont RF. Use of C-reactive protein as a predictor of chorioamnionitis in preterm prelabour ropture of membranes: a systematic review. *BJOG* 2007; 114: 796–801
21. Van de Laar R, Van der Ham DP, Oei SG, Willekes C, Weiner CP, Mol BWJ. Accuracy of C-reactive protein determination in predicting chorioamnionitis and neonatal infection in pregnant women with premature ropture of membranes: A systematic review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2009; 147: 124-129
22. Torricelli M, Voltolini C, Conti N, Vellucci FL, Orlandini C, Bocchi C, Severi FM, Toti P, Buonocore G, Petraglia F. Histologic chorioamnionitis at term: implications for the progress of labor and neonatal wellbeing. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2012; Early Online: 1-5

23. Gordon A, Lahra M, Raynes-Greenow C, Jeffery H. Histological Chorioamnionitis Is Increased at Extremes of Gestation in Stillbirth: A Population-Based Study. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2011; Article ID 456728, 7 pages
24. Ministero della salute, Sistema nazionale per le linee guida: Gravidanza fisiologica aggiornamento 2011
25. Dainelli B, Oliva B, Taraborelli T, Tempera G, Toni M: Metodi diagnostici di laboratorio. In: *Microbiologia Medica*. Elliot T, Hastings M, Desselberger U, Terza Edizione, eds EMSI, Roma, 199, 173-176
26. American College of Obstetricians and Gynecologists: Antibiotics for preterm labor. Committee Opinion No. 445. *Obstetrics and Gynecology* 2009; 114: 1159-60
27. Pescetto G, De Cecco L, Pecorari D, Ragni N: Taglio cesareo. In: *Ginecologia e Ostetricia*, vol. 2. Società Editrice Universo, Perugia, 2009 pp 1193
28. Bombelli F, Castiglioni MT: Patologia della gravidanza. In: *Ginecologia e Ostetricia*. Società Editrice Esculapio, Bologna, 2001 pp 447-448, 458
29. DiGiulio DB: Diversity of microbes in amniotic fluid. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2012; 17: 2-11
30. Bombelli F, Castiglioni MT: Le flogosi dell'apparato genitale femminile. In: *Ginecologia e Ostetricia*. Società Editrice Esculapio, Bologna, 2001 pp 175-179
31. Seong HS, Lee SE, Kang JH, Romero R, Yoon BH: The frequency of microbial invasion of the amniotic cavity and histologic chorioamnionitis in women at term with intact membranes in the presence or absence of labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecologists* 008;199:375.e1-375.e5
32. Kirchner L, Helmer H, Heinze G, Wald M, Brunbauer M, Weninger M, Zaknun D: Amnionitis with *Ureaplasma urealyticum* or other microbes leads



to increased morbidity and prolonged hospitalization in very low birth weight infants. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2007; 134: 44–50

33. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, Kim CJ, Erez O, Edwin S, Relman DA: Microbial Prevalence, Diversity and Abundance in Amniotic Fluid During Preterm Labor: A Molecular and Culture-Based Investigation. *PLoS ONE* 2008; 3(8): e3056. doi:10.1371/journal.pone.0003056
34. Keski-Nisula L, Aalto MJ, Katila ML, Kirkinen P: Intrauterine Inflammation at Term: A Histopathologic Study. *Human Pathology* 2000; 31(7): 841-846



## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio il personale dell'U.O. di Microbiologia e Virologia dell'Università degli Studi di Padova per la pronta disponibilità ed efficienza nell'accettare e refertare il materiale raccolto.

Ringrazio particolarmente la Dott.ssa Elena Castellani e la Dott.ssa Caterina Boldrin per l'indispensabile studio dei campioni microbiologici.

Ringrazio la Dott.ssa Elisa Breda per avermi accompagnata nel mio percorso di tesi.

Ringrazio il Dott. Salvatore Gizzo per l'aiuto datomi nell'analisi statistica dei dati.

Ringrazio il personale ostetrico, infermieristico e medico dell'U.O.C. Clinica Ginecologica e Ostetrica per avermi dato la possibilità di raccogliere il materiale di tesi in Sala Parto, nei reparti di Ostetricia e Puerperio.

Grazie al mio Mentore, per avermi trasmesso la passione per questa professione, per la severità, il silenzioso sostegno, l'amore per il servizio.

Grazie alle mie Colleghe, per avermi aiutato a raccogliere quanto era necessario per questa tesi, ma soprattutto per i tre anni passati insieme a studiare, a crescere, a confrontarci, a imparare cosa vuol dire far parte di un gruppo.

Grazie alla mia Famiglia, ai miei Amici, a chi è appena arrivato e a chi arriverà.