

BIOLOGIA DEL *TRICHOMONAS VAGINALIS* E DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLE INFEZIONI DA ESSO PROVOCATE

G. A. MELONI

Istituto di Microbiologia
dell'Università di Padova
(Direttore: Prof. G. A. Meloni)

SUMMARY

Biology of *Trichomonas vaginalis* and laboratory diagnosis of trichomoniasis.

The A. examines some relevant problems in the taxonomy of the Protozoa and describes the morphological characteristics of *Trichomonas vaginalis* such as they emerge from the observation of stained smears and from the ultrastructural studies by electron microscopy.

The biology and pathogenicity of this protozoon and the clinical aspects of *T. vaginalis* infection in the male and female are then summarized in order to better explain the practical problems of collection, transport and handling of specimens for laboratory examination.

The fundamental procedures utilized for processing these specimens (microscopic observation of motile trichomonads in wet preparations, examination of stained smears and cultivation) and immunodiagnostic methods are described. The poor practical usefulness of the serological survey is pointed out.

The A. puts forward a few comments on the relationships between trichomonads and some opportunistic members of vaginal microbiota. Finally, some considerations on the treatment of trichomoniasis are advanced, with particular attention to the drugs that proved to be simultaneously active against the protozoa, the fungi and the mycoplasmas.

Secondo la scaletta espositiva concordata fra i relatori, ho il compito di illustrarvi le caratteristiche biologiche del *Trichomonas vaginalis* e la sostanza metodologica delle tecniche utilizzate per la diagnosi di laboratorio delle infezioni da esso provocate. Cercherò, pertanto, di restare fedele a questo schema, pienamente consapevole dell'esigenza di preparare il terreno ai successivi interventi che, più direttamente, tratteranno degli aspetti clinici di un'affezione indubbiamente più complessa di quanto potrebbe apparire ad una valutazione superficiale. I ginecologi, i dermatologi e gli urologi hanno vasta esperienza in proposito e, per esempio, al di là degli aspetti patologici più strettamente connessi con la presenza del parassita, ben sanno quali e quanto notevoli ripercussioni la trichomoniasi può avere sia sulla psiche sia sulla vita di relazione dei soggetti colpiti.

Dallo schema riportato in fig. 1 balza evidente la complessità dei problemi eziologici delle infezioni che possono colpire l'apparato uro-genitale, con particolare riferimento a quello femminile: in realtà ci troviamo di fronte ad una varietà di «interventi» che interessano tutti i settori del-

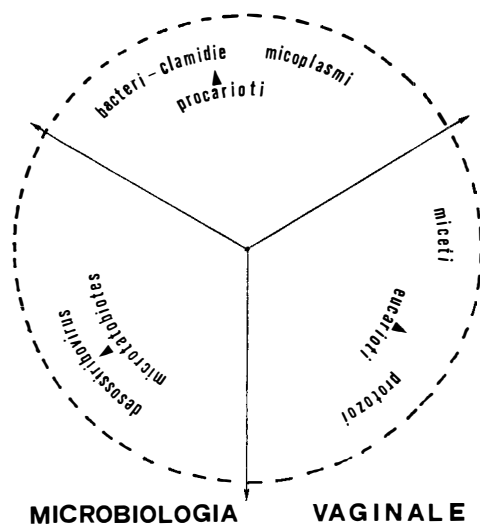


Fig. 1. — Microrganismi responsabili di infezioni vaginali.

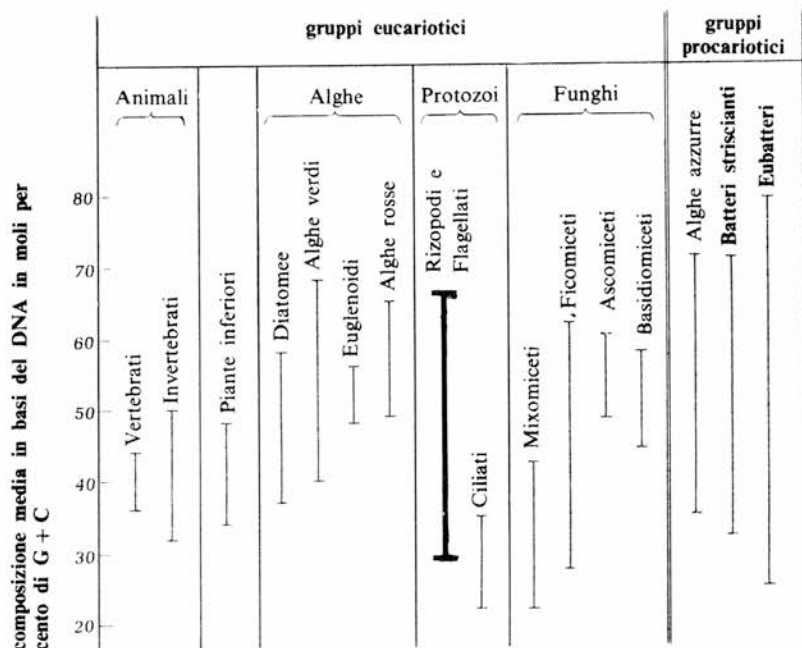


Fig. 2. — Contenuto medio G+C del DNA nei principali gruppi biologici espresso in % sul totale delle basi.

la microbiologia. Ovviamente il programma ci impone, però, di stralciare da questo vasto insieme soltanto alcuni aspetti fondamentali relativi agli eucarioti e, nell'ambito di questi, ai protozoi con specifico riferimento ai *Trichomonas*.

Dal punto di vista tassonomico può essere ricordato che il *T. vaginalis* appartiene al phylum *Protozoa*, subphylum *Sarcomastigophora*, superclasse *Mastigophora* (flagellati) genere *Trichomonas*. È interessante sottolineare che il DNA dei *Mastigophora* ha un contenuto G+C, espresso in moli % sul totale delle basi, posto fra 30 e 56%, fra i più alti nell'ambito dei protozoi. Tale riferimento significativamente si inserisce nel vivo di attualissimi problemi di tassonomia molecolare (*).

Sebbene nell'ambito del genere *Trichomonas* siano note tre specie capaci di infettare l'uomo (il *T. tenax* della bocca; il *T. hominis* dell'intestino ed il *T. vaginalis* del

tratto genito-urinario) soltanto all'ultima, che è anche la specie-tipo, può essere attribuita una chiara importanza clinica, in quanto responsabile nella donna di almeno il 25% delle vaginiti e di cervicitì e nel maschio di uretriti e prostatiti, il tutto secondo una distribuzione geografica estesa a tutto il mondo.

Descritto dal francese Donné nel 1836, coltivato da Lynch nel 1915 e da Trussel (¹⁶) nel 1940, in terreni non addizionati di sospensioni batteriche, questo protozoo

(*) Com'è noto, le quattro basi costitutive del DNA sono A, T, G e C e, nel caso del DNA bicatenario le leggi del loro accoppiamento richiedono che A sia egualmente frequente di T e G di C, senza che ciò, tuttavia, comporti alcuna limitazione al rapporto molare (G+C):(A+T).

La composizione in basi è un carattere di estrema importanza tassonomica e il contenuto medio G+C espresso in moli % sul totale delle basi è caratteristicamente costante per ciascuna specie.

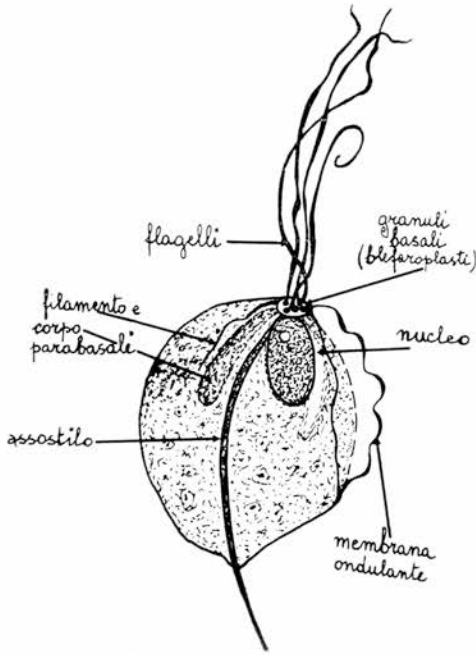


Fig. 3.

flagellato presenta un'organizzazione cellulare che è ormai esaurientemente nota anche a livello ultrastrutturale. Tutti i membri del genere *Trichomonas* si ritrovano soltanto allo stadio di trofozoita e non danno luogo a formazione di cisti, le rare descrizioni in proposito essendo riferibili ad artefatti (Macfarlane). Il *T. vaginalis* è di forma ovalare con una lunghezza ed una larghezza medie di 13×7 fino ad un massimo di $27 \times 18 \mu\text{m}$, dimensioni queste lievemente maggiori rispetto a quelle del *T. tenax* e del *T. hominis*, i quali, inoltre, non posseggono un corpo parabasale (⁷).

Nel *T. vaginalis* sono individuabili diverse strutture subcellulari. La figura 3 riassume i dati desumibili dalla microscopia ottica ed è idealmente completata dalla fig. 4 nella quale viene riportata una ricostruzione diagrammatica che tiene conto anche dei particolari che emergono dalle osservazioni al microscopio elettronico. Per una miglior interpretazione di queste immagini è opportuno ricordare come in letteratura siano stati usati diversi sinonimi per indicare una stessa struttura. Per esempio, la fibrilla ricorrente

viene anche chiamata filamento parabasale o flagello ricorrente e i kinetosomi vengono talvolta indicati anche come granuli basali, kinetoplasti o blefaroplasti.

Oltre al nucleo, caratteristicamente allungato e all'assostilo, che attraversa l'intera cellula oltrepassandone i margini, si individuano quattro flagelli anteriori originantisi dai corrispondenti kinetosomi. Dal quinto kinetosoma, localizzato in posizione centrale, si diparte la fibrilla ricorrente che è attaccata al margine della membrana ondulante per tutta la lunghezza di questa. Sia i flagelli anteriori sia la fibrilla ricorrente, se osservati in sezione al M.E. rivelano la classica organizzazione «9+1», costituita da una corona circolare di 9 coppie di microtubuli disposta attorno ad una coppia centrale.

Si notano, inoltre, la pelta (o scudo) dell'assostilo, la costa (con la sua caratteristica alternanza delle bande), i filamenti accessori, il corpo parabasale, il reticolo endoplasmico, i granuli paracostali ed i granuli assostilari. Dato importante, e non soltanto dal punto di vista dell'ultrastruttura, è l'assenza di mitocondri.

Circa il ciclo biologico del *T. vaginalis* (ammesso che se ne possa parlare nel senso classico del termine) c'è ben poco da ricordarvi. Si tratta della unica specie di protozoi trasmissibile nell'uomo con il rapporto sessuale: in condizioni naturali esso è presente soltanto nel tratto urogenitale umano, si moltiplica per fissione binaria, con divisione mitotica del nucleo e, come già detto, non dà luogo a formazione di cisti.

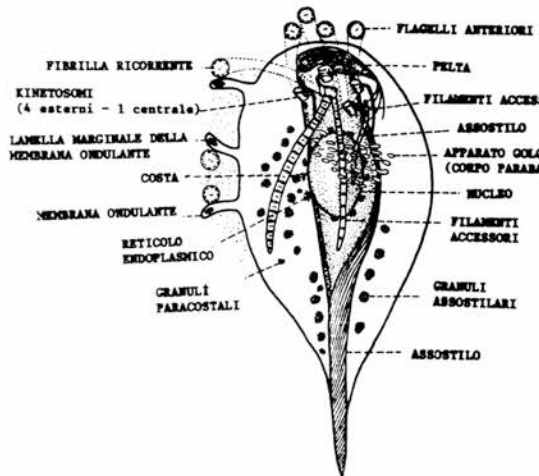


Fig. 4.

Rarissima è l'infezione mediata da materiali contaminati (bidet, asciugamani, ecc.) in quanto il parassita sopravvive poco in ambiente umido e muore rapidamente in ambiente secco; secondo Burrows (2) nel giro di un'ora.

Nella donna si moltiplica attivamente a livello della mucosa vaginale con abbondante desquamazione delle cellule epiteliali e con una secrezione ricca di leucociti.

Nel maschio l'infezione si localizza a livello uretrale e può raggiungere la prostata con chiara tendenza alla cronicizzazione.

Il *Trichomonas vaginalis* è responsabile di circa il 50% delle leucorree; la vaginite da esso provocata comporta la comparsa di perdite lattescenti, fluide, schiumose, irritanti, spesso di odore fetido, con prurito vulvare e bruciori alla minzione, poiché nel 75% dei casi l'infezione si propaga all'uretra. Il pH vaginale è elevato, mediamente posto attorno a 6, con valori estremi tra 5 e 8 (4). Nell'uomo, l'uretrite da *T. vaginalis*, che costituisce circa il 30% delle NGU, assume spesso un andamento leggero, talvolta asintomatico, e spesso senza secrezione. L'infezione può, però, esser complicata da una sovrapposizione batterica, con insorgenza di uretrite purulenta e prostatite.

Queste brevi note sulla sintomatologia erano a mio avviso indispensabili per un più organico avvio del discorso sui problemi diagnostici.

Anche se, sul piano teorico, la diagnosi di laboratorio delle infezioni da *T. vaginalis* potrebbe seguire gli schemi classici della dimostrazione dell'agente responsabile nei materiali idonei e della ricerca degli anticorpi nel siero del paziente, si deve senz'altro affermare che soltanto la prima via può avere pratica applicazione.

A questo punto, sorge l'esigenza di esaminare il problema del prelievo del materiale destinato all'esame microbiologico. Nella trichomoniasi vaginale gli autori francesi consigliano di prelevare due campioni; uno a livello del meato uretrale e l'altro a livello del 3° posteriore della va-

gina (nella zona corrispondente al fornice posteriore). Dato che, come si è visto, la secrezione è abbastanza fluida, è preferibile aspirarla ricorrendo ad una pipetta di plastica.

Nel maschio potrà essere esaminato un campione della secrezione uretrale o del liquido prostatico (dopo massaggio) o il sedimento delle prime urine. Il prelievo dei suddetti campioni dovrà essere effettuato prima della minzione mattutina. La ricerca del *T. vaginalis* può esser fatta mediante: a) esame microscopico a fresco; b) esame microscopico di preparati fissati e colorati; c) attraverso semina dell'essudato in idonei terreni di coltura.

Mentre nel caso dei prelievi vaginali sono utilizzabili tutti e tre questi metodi, nel caso dei prelievi effettuati dal maschio l'esame a fresco (che consiste nell'accertamento della mobilità del protozoo) non è praticamente utilizzabile in quanto i parassiti si presentano quasi sempre immobili.

Per l'esame a fresco, da eseguirsi immediatamente dopo il prelievo, la secrezione, diluita con un po' di soluzione fisiologica, può esser osservata sia con il microscopio in luce diretta, sia con il microscopio in contrasto di fase. Nicoli e Timon-David (10) dopo aver confrontato il rendimento di ben 9 coloranti vitali, da soli o in associazione, consigliano l'uso di una miscelanza di una parte di violetto di genziana e due parti di blu di toluidina. Tale metodo permetterebbe di porre in evidenza sia i batteri, i miceti e le cellule animali copresenti, sia le cellule del *Trichomonas* che appaiono incolori mentre i flagelli assumono una delicata tinta blu scuro, conservando il caratteristico movimento a frusta.

L'esame dopo fissazione e colorazione, che nel caso dei prelievi dal maschio, è l'unico che dia affidamento, è utilissimo anche nel caso dell'essudato vaginale, soprattutto perché consente l'invio a distanza degli strisci. Sebbene siano state proposte numerose tecniche di colorazione, il metodo di Giemsa è, a mio avviso, da prefe-

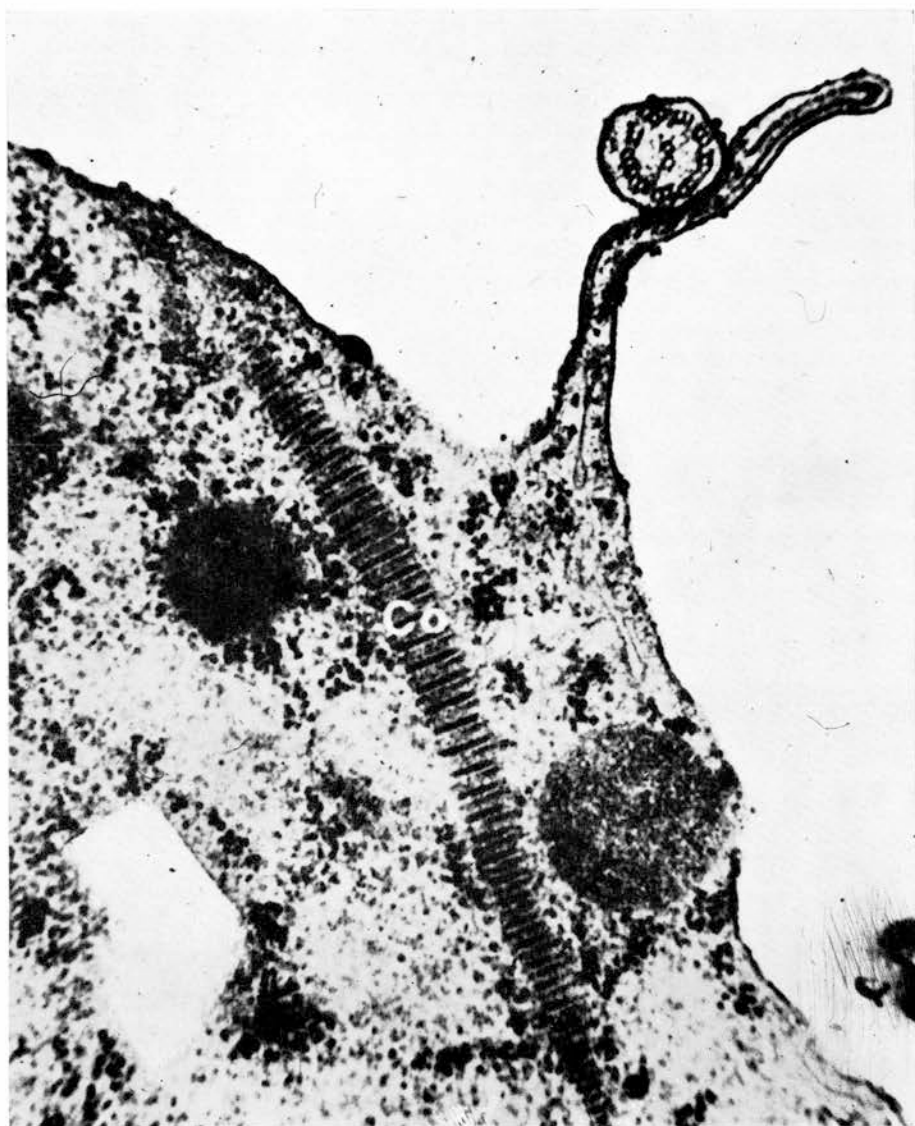
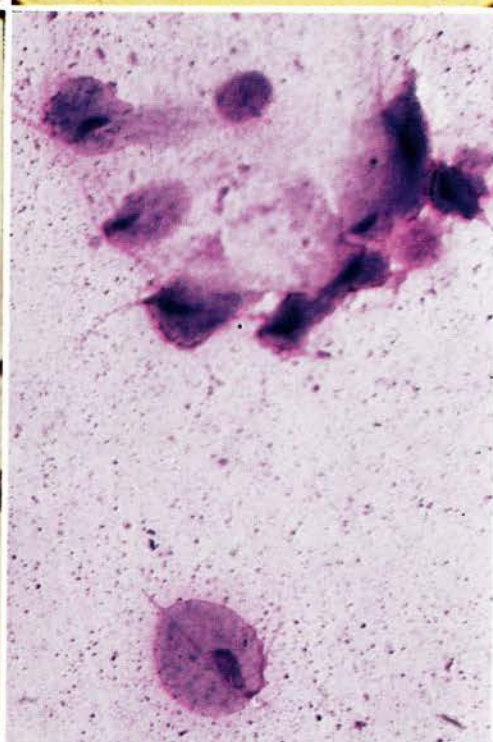
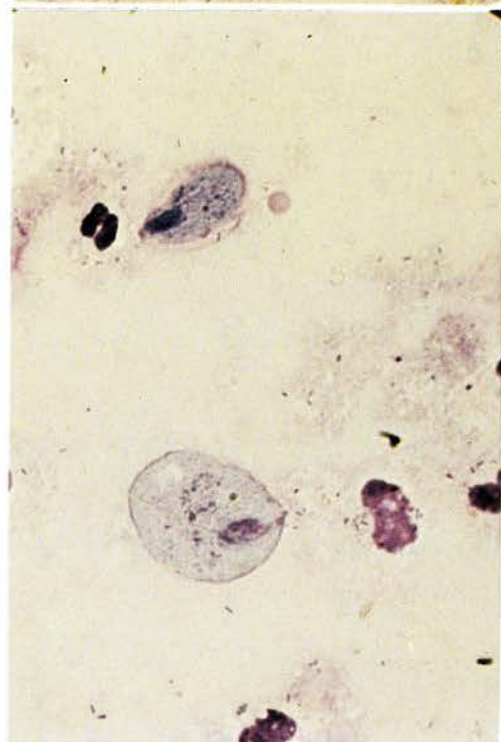
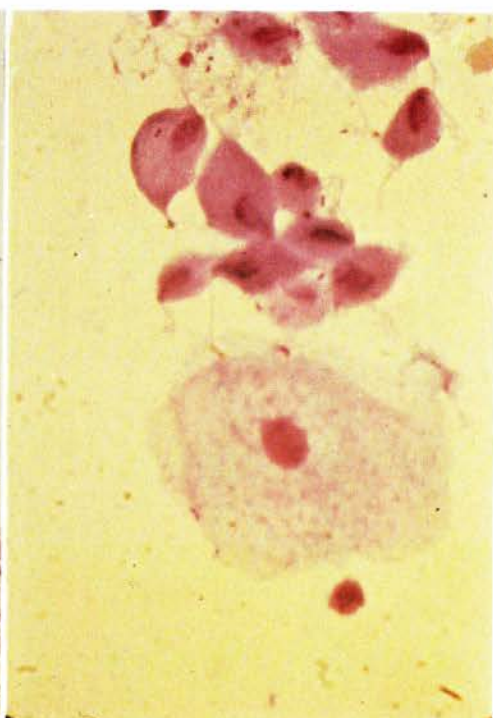
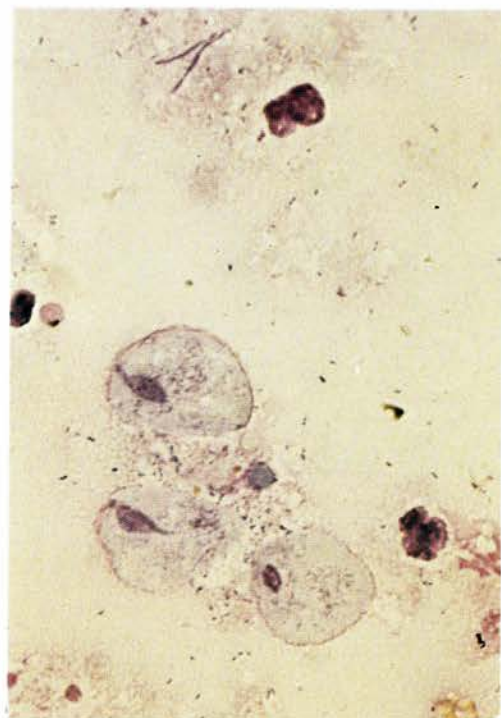


Fig. 5. — Particolare della microscopia elettronica di una cellula di *T. vaginalis* osservata in sezione ultrasottile ad elevato ingrandimento. Da notare, tra l'altro, la «costa» con la caratteristica alternanza di bande elettrondense ed elettrortrasparenti, la membrana ondulante e, accollato a questa, il flagello ricorrente con la classica organizzazione (9+1) dei microtubuli.

Fig. 6. — Questa tavola composita (le cui microfotografie hanno tutte un ingrandimento finale di circa 1000×) illustra i vari aspetti con i quali si può presentare il *T. vaginalis* negli strisci di essudato vaginale colorati con il metodo di Giemsa. La variabilità cromatica dipende dai tempi diversi di esposizione del preparato alla miscela colorante, come appunto può verificarsi nella corrente pratica di laboratorio. Nella parte superiore della foto di destra in basso si noti la presenza di nove parassiti caratteristicamente disposti a corona attorno ad una cellula epiteliale.



rire sia per il superlativo rendimento anche a livello della indagine citologica sia per la sua semplicità di esecuzione (fig. 6).

Dopo una fissazione con alcool metilico per 5 minuti (o se si vuole con May-Grunwald) si fa agire per 20-30 minuti la soluzione di Giemsa (1:20), allestita in tampone pH 6,8.

Con questa colorazione le caratteristiche morfologiche del *Trichomonas* risaltano con notevole evidenza: citoplasma in blu azzurro; nucleo rossastro; assostilo e flagelli in rosso vivo. La conservazione dell'integrità dei flagelli, data la loro fragilità, non è sempre ottenibile e, in ogni caso, la loro dimostrazione richiede un'attenta supercolorazione del preparato.

La ricerca del parassita nei preparati colorati con il Papanicolaou deve esser assolutamente evitata poiché si rischia di andare incontro ad una probabilità di errore del 50% (false-positività e negatività): inoltre la presenza del *T. vaginalis* e le alterazioni cellulari da questo provocate possono essere addirittura fonte di errore nella lettura dei preparati colorati con il Papanicolaou per la diagnosi del cancro.

Alcuni autori hanno preconizzato il cosiddetto metodo di Giemsa lento che comporta il trattamento con soluzione di Giemsa 1:20 in tampone a pH 7,2 per 24 ore, in camera umida e decolorazione controllata con acetone per 30 secondi.

È bene ricordare che nei prelievi dall'uretra maschile il parassita appare più frequentemente di forma rotondeggiante e che nei prelievi dalla vagina è, assai spesso, possibile osservare i protozoi caratteristicamente disposti a corona attorno a cellule dell'epitelio vaginale.

Come indagine accessoria merita, infine, citazione il metodo dell'immunofluorescenza (diretta o indiretta) mediante l'impiego di antisieri anti-*Trichomonas*.

Circa la prova colturale che, come per l'esame a fresco, deve essere allestita immediatamente dopo il prelievo, si può affermare che essa è praticamente superflua

qualora l'esame microscopico abbia fornito esito positivo.

La coltura può essere allestita sia mediante semina diretta dell'essudato sia dopo aver mescolato questo con un po' di terreno liquido (1 goccia di essudato + 2 gocce di brodo).

In accordo con Nicoli e Timon-David⁽¹⁰⁾, si deve affermare che, da un punto di vista generale, non si può parlare di una vera e propria coltura, quale si realizza nel caso di altri microrganismi. Certamente il *Trichomonas* si riproduce in questi terreni, ma si tratta di colture fragili, che necessitano di continui e ripetuti passaggi, con cellule che rivelano chiari segni di sofferenza, arrotondate, vacuolizzate, torpide, biologicamente depresse. Ben diverse, in ogni caso, da quelle che si osservano con l'esame diretto dell'essudato. E forse, il lungo elenco di terreni proposti per la coltura del *T. vaginalis* è filiazione diretta di tali difficoltà e deriva soprattutto dal fatto che ancora non si dispone di un terreno che veramente garantisca una riproduzione ottimale di questo protozoo. Le esigenze nutritive del *T. vaginalis* sono elevate: necessità di siero, glutamina, cistina o cisteina e, secondo Kupfenberg e coll., di una sostanza S presente nell'estratto di pancreas. I vari terreni consigliati per la coltura contengono pertanto siero ed estratti di tessuti animali, con aggiunta di penicillina o più raramente streptomycin o cloramfenicolo, allo scopo di eliminare la flora batterica copresente. È bene a questo proposito ricordare che le normali secrezioni vaginali contengono per ml oltre 10^8 CFU (100 milioni di batteri viventi). Molti di questi terreni, che possono essere monofasici o difasici, contengono amido, la cui presenza è considerata utile quale supporto meccanico ai flagelli.

La mia esperienza personale sulla coltura del *T. vaginalis* non è vasta, ma ritengo soddisfacente l'adozione di quello di Kupferberg, Jonhson e Sprince, addizionato di cloramfenicolo. Buoni risultati fornisce anche quello di Dobell e Laidlaw. Lo

sviluppo dei parassiti si osserva dopo 2-3 giorni di incubazione.

Gli studi istopatologici e anatomo-patologici in corso di cervicite da *Trichomonas* confermano la capacità del parassita di attaccare l'epitelio squamoso. Dopo una iniziale risposta di tipo iperemico, si verifica papillite, edema, erosione degli strati superficiali e necrosi. La dilatazione dei vasi superficiali e le emorragie focali comportano la comparsa di quelle alterazioni che vengono descritte sotto il nome di « cervicite a fragola ». Ma di ciò potranno dire, con maggiori dettagli, i colleghi che interverranno dopo di me.

Anche se, come già accennato, la ricerca degli anticorpi anti-*Trichomonas vaginalis*, ha scarsa utilità clinica, non posso fare a meno di esaminare brevemente questo problema. Premesso che è stata dimostrata l'esistenza di almeno 8 sierotipi di *T. vaginalis*, peraltro in possesso anche di antigeni comuni (Kott e Adler) ⁽⁶⁾, deve esser ricordato che le tecniche immunologiche finora utilizzate sono l'agglutinazione, la fissazione del C., l'agglutinazione in capillari con controllo al microscopio, la immunofluorescenza indiretta (con colture di T.V.) e l'emoagglutinazione passiva con eritrociti « vettori » di un antigene polisaccaridico estratto dal *Trichomonas* e un test intradermico.

Il test di agglutinazione venne messo a punto da Trussel nel 1946 e quello di agglutinazione in capillari da Freimberg nel 1952. I risultati di una serie di ricerche condotte da Teras e Coll. indicano che agglutinine anti-*Trichomonas* possono essere presenti anche nel siero di soggetti « normali » ma nei malati tali anticorpi superano il titolo di 1/80, considerato dagli autori come livello massimo di normalità.

Jaakmees e Coll. ⁽³⁾ nel 1966 hanno esaminato 171 soggetti colpiti dall'infezione dimostrando la presenza di anticorpi FC in ben 170 di essi, con la completa negatività di un gruppo di sieri di controllo. Tali anticorpi permanevano dimostra-

bili per almeno un anno. Il comportamento del test cutaneo fornì risultati non concordanti con quelli dell'agglutinazione e della fissazione del C. Nello stesso anno il russo Korik ⁽⁵⁾ ha comunicato che gli anticorpi F.C. erano dimostrabili soltanto nel 10% dei malati mentre la ricerca dell'antigene trichomonico effettuata con antisieri di uomo e di coniglio fornì l'85% di positività. A parte la non univocità dei risultati suddetti, ritengo di poter concludere che, sia per l'insoddisfacente messa a punto dei metodi sia per la sostanza clinica dell'affezione, la ricerca degli anticorpi anti-*Trichomonas* si presenta almeno, fino ad oggi, priva di utilità diagnostica e potrebbe aver applicazione soltanto nell'ambito di indagini epidemiologiche.

Dalle precedenti considerazioni sui metodi di laboratorio per la diagnosi di trichomoniasi, possono, dunque, esser tratte le seguenti conclusioni pratiche:

1) quando possibile effettuare l'osservazione a fresco;

2) sui materiali prelevati dal maschio e su quelli vaginali, negativi all'esame a fresco, o eventualmente come conferma dei positivi esaminare gli strisci colorati con il Giemsa;

3) l'allestimento delle colture deve esser praticato sugli essudati negativi all'esame eseguito con i due metodi prima citati.

Vorrei, infine, sottolineare che la presenza del *Trichomonas* nella vagina è direttamente connessa con una condizione di dismicrobismo a carico della flora esistente di questa nicchia ecologica. L'elevazione dei valori del pH che costantemente accompagna la dimostrazione del parassita sta ad indicare la cessazione o l'inefficienza quantitativa di quella sorta di « sorveglianza biologica » che è operata dal *L. acidophilus*. Il glicogeno degli estrogeni viene infatti attaccato dai lactobacilli con produzione di acido lattico, a sua volta responsabile dei bassi valori fisiologici del pH vaginale.

Tale discorso pertinentemente si inserisce nel problema delle associazioni microbiche e, a tal proposito, meritano citazione le ricerche di Bonissol e Coll.⁽¹⁾ che, nel 1972, hanno osservato che gli isolamenti dell'*U. urealyticum* erano più frequenti nei soggetti in cui era presente il *T. vaginalis* (72%). Questo tipo di associazione può essere interessante in rapporto al fatto che i valori di pH che si dimostrano in presenza del *Trichomonas* sono ottimali per la riproduzione di questa specie micoplasmica. Ma, al di là degli aspetti teorici, tale problema può avere risvolti pratici proprio a livello terapeutico. Senza interferire nell'esposizione dei colleghi che tratteranno della terapia, vorrei precisare che l'ormai dimostrata importanza degli ureaplasmi come causa di uretriti e di vaginiti impone di considerare l'opportunità di impiegare farmaci che, ad un tempo, siano attivi sul *Trichomonas* e sugli *Ureaplasmi*.

In tal senso la Mepartricina si presenta come antibiotico di scelta, in quanto recentissime nostre ricerche hanno dimostrato che questo poliene eptaenico, tanto efficace nel trattamento delle infezioni da *T. vaginalis* è spiccatamente attivo sui micoplasmi in genere e sugli ureaplasmi in particolare⁽⁹⁾. Tale attività è da ricollegarsi con la presenza di colesterolo nella membrana dei micoplasmi, fatto questo che è un esempio unico nel mondo dei procarioti. È ben noto infatti che gli steroli rappresentano il bersaglio molecolare dell'attività degli antibiotici polienici. Se a ciò si aggiunge che, nelle già citate ricerche di Bonissol⁽¹⁾, è stata anche dimostrata una buona frequenza di associazione tra ureaplasmi e *Candida albicans* (44%) la terapia con Mepartricina acquista un'ulteriore indicazione, essendo tale antibiotico notevolmente attivo anche sui miceti. Tutto ciò senza considerare che detto poliene è privo di attività mutagena e notevolmente meno tossico di altri antiprotozoari ed anti-fungini⁽¹²⁾.

Tra i farmaci attivi sul *Trichomonas vaginalis* trova preminente collocazione il Metronidazolo il cui largo impiego terapeutico è a tutti noto. A questo proposito, però, non si può fare a meno di ricordare che la sua mancanza di azione sulla *Candida* può, non infrequentemente, favorire l'emergere di vaginiti provocate da tale micete. Altrettanto opportuna mi pare la citazione delle ricerche di Rustia e Shubik⁽¹³⁾ i quali hanno dimostrato che il Metronidazolo è carcinogeno per i topini. A questi risultati debbono, inoltre, essere associati quelli delle numerose indagini nelle quali l'attività mutagena del Metronidazolo e di altri nitroimidazoli è stata posta in evidenza attraverso prove effettuate sui batteri^(11, 14, 17).

Con ciò ritengo di poter chiudere la mia esposizione, con il proposito di ulteriormente approfondire gli argomenti trattati, in sede di discussione.

RIASSUNTO

Dopo aver esaminato gli aspetti più salienti della tassonomia dei protozoi, con particolare riferimento al *Trichomonas vaginalis*, l'A. descrive le caratteristiche morfologiche di tale parassita quali emergono dall'osservazione al microscopio ottico e dallo studio ultrastrutturale al microscopio elettronico.

Successivamente viene affrontato il problema della patogenicità del protozoo e delle affezioni da esso provocate nel maschio e nella femmina, precisando le modalità di prelievo del materiale patologico destinato alle indagini di laboratorio.

Vengono, poi descritti sia i metodi diagnostici utilizzati per lo studio di detto materiale (osservazione microscopica a fresco o dopo colorazione e prove colturali) sia le tecniche di immunodiagnosi, non senza aver sottolineato la scarsa utilità pratica della ricerca degli anticorpi.

L'A. avanza, infine, alcune considerazioni sul significato della presenza del *T. vaginalis* nell'ambito dei rapporti con alcuni membri opportunisti del microbiota vaginale.

Nelle conclusioni è contenuto un breve cenno ad alcuni importanti farmaci antiprotozoari e, fra questi, a quelli che si rivelano contemporaneamente dotati di attività anti-fungina ed antimicoplasmica.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bonissol C., Bosquet C. e Durieux M. F.: *Path. Biol.*, 20, 909-918, 1972.
- 2) Burrows W.: *Textbook of Microbiology*, XX ediz., Saunders Co., Philadelphia, 1973.
- 3) Jaakmees e coll. (1966) citati da Wilson.
- 4) Jouy H.: *Les urétrites chez l'homme. Les exudats vaginaux*, in Fabre A., Fabiani G., Jouy H.: *Études des liquides organiques et des produits pathologiques*. Ed. de la Tourrelle, St. Maudé, 1967.
- 5) Korik (1966) citato da Wilson.
- 6) Kott e Adler S.: *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 55, 333-338, 1961.
- 7) Macfarlane L. R. S.: *Human Protozoology and Helminthology*. 2ª ediz. Livingstone L. T. D., Edimburgh, 1969.
- 8) Meloni G. A., Busolo F., Conventi L. e Bertoloni G.: *Boll. Ist. Sieroter. Milanese*, 56, 7-14, 1977.
- 9) Meloni G. A., Busolo F., Bortolon P. e Ruozzi P.: *In vitro antimycoplasmal activity of Mepartricin* (in corso di stampa).
- 10) Nicoli R. M. e Timon-David P.: *Rev. Franç. Gynéc.*, 68, 173-184, 1973.
- 11) Rosenkranz H. S., Speck W. T. e Stambaugh J. E.: *Mutat. Res.*, 38, 203-206, 1976.
- 12) Ruozzi P. e Siccardi A. G.: *Mepartricin, a polyene active on both Trichomonas and Candida. Lack of mutagenic activity*. «Symposium International sur la Trichomonase genito-urinaire» (S.I.T.G.U.), Parigi 1977.
- 13) Rustia M. e Shubik P.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 48, 721-729, 1972.
- 14) Speck W. T., Stein A. B. e Rosenkranz H. S.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 56, 283-284, 1976.
- 15) Stanier R. Y., Doudoroff M., e Adelberg E. A.: *The microbial world*. 3ª ediz. Prentice Hall Inc.; Englewood Cliffs, N.J. 1970.
- 16) Trussel R. E.: *Trichomonas vaginalis and trichomoniasis*. Ed. Thomas, Springfield, Illinois 1947.
- 17) Voogd C. E., Van Der Steel J. J. e Jacobs J. J. A. A.: *Mutat. Res.*, 26, 483-490, 1974.
- 18) Wilson R. J. M.: *Diagnosis of Protozoal Diseases*, in Gell P. G. H., Combs R. R. A., Lauchmann P. J.: *Cinical aspects of Immunology*, 3ª ed. Blackwell Scient. Publ., Oxford 1975, pag. 143.