

**IMPIEGO DEL DODECIL-DI (BETA-OSSIETIL)
BENZILAMMONIO-CLORURO [BACTOFEN®]
COME DECONTAMINANTE NELL'ESAME CULTURALE
PER LA RICERCA DEL BACILLO DI KOCH NELL'ESCREATO**

P. CARPI TORELLI

E. TORTOLI

Arcispedale « Santa Maria Nuova » di Firenze - Laboratorio di Bacteriologia e Virologia (Direttore: Prof. A. Lamanna).

SUMMARY

USE OF BACTOFEN® TO DECONTAMINATE SPUTUM FOR CULTURE OF « MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ».

We tried to see whether it was possible to use Bactofen® to decontaminate sputum for culture of *Mycobacterium tuberculosis*.

Bactofen® showed very little bactericidal action on tubercle bacilli, lower than Desogen®, and selectively destroyed many contaminants, more actively than benzalkonium chloride.

Digested sputum decontaminated with 0.2 % Bactofen® and then applied to culture media without centrifugation gave good results in growth of colonies.

Le caratteristiche del *Mycobacterium tuberculosis*, tra le quali risaltano la lentezza di moltiplicazione e la resistenza ad alcool, acidi ed a gran parte dei disinfettanti, lo pongono su un piano completamente diverso rispetto a tutta le restante flora batterica.

Le ricerche di laboratorio sfruttano proprio la particolare refrattarietà del bacillo tubercolare; così mentre la alcool-acido resistenza è alla base delle colorazioni (Ziehl-Neelsen; fluorescenza) che ne permettono l'individuazione microscopica, alla resistenza ai vari disinfettanti si ricorre in tutte le tecniche di coltura. Infatti, in molti materiali patologici (escreati ed urine in primo luogo) al bacillo di Koch si associa solitamente una flora batterica più o meno abbondante che, dato l'enorme divario tra la velocità di crescita di quest'ultima, per la quale sono più che sufficienti 48 ore di incubazione, e quella dei Micobatteri, le cui colonie non sono visibili prima di una ventina di giorni, deve essere eliminata in modo che il suo sviluppo non renda impossibile, per fenomeni di concorrenza vitale od a causa della degradazione del terreno di coltura, la moltiplicazione del bacillo tubercolare.

Lavoro giunto in Redazione il 3 Gennaio 1980.

Proprio una tale decontaminazione costituisce il momento critico di tutta l'operazione, dato che non è ancora stata trovata una sostanza che abbini ad una completa mancanza di lesività verso i Micobatteri una totale azione inibente nei confronti di tutta la flora associata. Molte sono le sostanze impiegate come decontaminanti ed altrettante le tecniche messe a punto per permettere la coltura anche quando la carica microbica molto bassa può sfuggire all'esame microscopico.

Un'esigenza molto sentita nell'esecuzione dell'esame colturale per bacillo di Koch è anche quella della semplicità della metodica, in modo da ridurre al minimo tutte quelle manipolazioni del materiale patologico che possono costituire un rischio per l'operatore, particolarmente quando la ricerca è eseguita routinariamente su un alto numero di escreti.

Nel nostro laboratorio buoni risultati sono stati raggiunti con l'impiego, ormai quinquennale, di una tecnica che prevede la fluidificazione dell'escreto, la decontaminazione con alfa (p-tolil)-dodecil-trimetilammonioossimetilsolfato [Desogen i[®], Geigy] ([2] [5] [6] [9] [10] [11]) e la semina del materiale su Lowenstein-Jensen senza centrifugazione.

La cessazione della produzione del Desogen i[®] che, a differenza del Desogen[®] profumato tutt'ora in commercio, non conteneva alcool etilico, ha reso necessaria la ricerca di un decontaminante alternativo che non comportasse l'introduzione di modifiche nella tecnica da noi usata.

L'obbiettivo che ci siamo proposti è stato quello di provare qualche nuovo composto dell'ammonio quaternario per vedere se presentasse caratteristiche tali da permetterne l'impiego come decontaminante, ed, in secondo luogo, di appurare se il cloruro di benzalconio, usato da vari Autori in tecniche piuttosto complesse ([3] [7]), potesse essere adottato nella metodica semplificata in uso nel nostro laboratorio.

Come oggetto della prova è stato scelto il dodecil-di (beta-ossietil) benzilammonio-cloruro [Bactofen[®], Geigy] la cui azione nei confronti di *Mycobacterium tuberculosis* sarebbe, in base ai dati riportati da alcuni Autori ([1] [8]), pressoché nulla, mentre notevole sarebbe quella verso gli altri microorganismi sia Gram-positivi che Gram-negativi (*Pseudomonas aeruginosa* compresa) e verso i miceti.

MATERIALE E METODI

Tutti gli escreti impiegati provenivano dalle Divisioni di Tisiologia dell'Arcispedale « Santa Maria Nuova » di Firenze ed è da alcuni di essi che sono stati isolati i Micobatteri con cui sono state allestite le sospensioni usate in alcune prove.

Tali escreti, prima di qualsiasi tipo di decontaminazione, sono stati fluidificati tenendoli a contatto per 30 min, in termostato a 37°C, nello stesso contenitore di raccolta, con un'uguale quantità di N-acetil-L-cisteina all'1,5% [4].

Il contatto con il decontaminante, qualunque esso fosse, è avvenuto in termostato a 37°C e successivamente di ogni campione sono stati seminati, senza che il decontaminante fosse allontanato, 0,5 ml in ciascun provettone di una coppia di Lowenstein Jensen.

I singoli composti di ammonio quaternario sono stati impiegati alle seguenti concentrazioni: Desogen i® allo 0,5 % in tampone Sorensen a pH 7; cloruro di benzalconio allo 0,215% in H₂O (soluzione pronta per l'uso BD-BBL); Bactofen® allo 0,2 %, allo 0,1 %, allo 0,02 % e allo 0,01 % in tampone Sorensen pH 7 (di queste ultime solo la diluizione allo 0,1 % è stata usata in tutte le prove; infatti quelle allo 0,02 % e allo 0,01 % sono state presto abbandonate perché risultate inidonee e quella allo 0,2 % è stata introdotta solo in un secondo momento).

Nella decontaminazione con Desogen i® impiegata di routine nel nostro laboratorio il prodotto viene aggiunto all'escreato in parti uguali (in pratica la quantità di Desogen i® necessaria è pari a metà del volume dell'escreato + fluidificante), il tempo di contatto è di 12 h e la semina (inoculo 0,5 ml per ciascun provettone di terreno) viene eseguita pescando con una pipetta Pasteur sul fondo del contenitore dove solitamente si ha un discreto sedimento.

Le prove atte ad accertare l'eventuale lesività dei decontaminanti nei confronti dei Micobatteri sono state eseguite dapprima su varie diluizioni di sospensioni batteriche standardizzate (Tab. I) quindi su sospensioni diluite in parallelo sia in soluzione fisiologica che in un pool di escreti negativi (provenienti da degenti non tubercolari) (Tab. II) ed, infine, su escreti alcuni dei quali, avendo tutti il batterioscopico per bacillo di Koch negativo ma provenendo da degenti con positività assai recenti, si supponeva potessero contenere cariche micobatteriche molto basse e scarsamente vitali (Tab. III).

TABELLA I

Proporzione tra il numero delle colonie sviluppatesi (inoculo 0,2 ml) da diluizioni successive (Intera = Mac Farland n° 1) di sospensioni in soluzione fisiologica di tre diversi stipiti di *Mycobacterium tuberculosis* dopo un tempo di contatto di 2 h con Bactofen® e con cloruro di benzalconio e quelle cresciute dallo stesso inoculo non trattato con i decontaminanti.

Diluizione della sospensione	Stipiti	Bactofen® 0,1 % %	Bactofen® 0,02 % %	Bactofen® 0,01 % %	Cloruro di benzalconio %
Intera	I	100	100	100	100
	II	100	100	100	100
	III	100	100	100	100
10 ⁻³	I	100	100	100	100
	II	100	100	100	100
	III	10	6	12	1
10 ⁻⁵	I	100	100	100	100
	II	100	100	100	100
	III	0	0	0	0

TABELLA II

Confronto tra l'azione (tempo di contatto 2 h) di 4 diverse diluizioni di Bactofen[®], 1 di cloruro di benzalconio ed 1 di Desogen i[®] (limitatamente a quest'ultima tempo di contatto 12 h) impiegate in parti uguali su sospensioni di bacilli tubercolari (densità = Mac Farland n° 1) diluite 1 : 10 rispettivamente in soluzione fisiologica (SF) ed in un pool di escreti (E) negativi fluidificati (inoculo 0,2 ml). N° delle prove: per Bactofen[®] 0,02% e 0,01% n° 4; per Bactofen[®] 0,2% n° 12; per Bactofen[®] 0,1%, cloruro di benzalconio e Desogen i[®] n° 16.

	Bactofen [®] 0,2%		Bactofen [®] 0,1%		Bactofen [®] 0,02%		Bactofen [®] 0,01%		Cloruro di benzalconio		Desogen i [®]	
	SF %	E %	SF %	E %	SF %	E %	SF %	E %	SF %	E %	SF %	E %
Crescita confluenta	42	67	37	88	25	50	25	25	56	69	0	12
Crescita > 100 colonie	33	25	50	6	25	0	25	0	25	25	19	19
Crescita ≤ 100 colonie	25	8	13	6	50	0	50	0	13	0	81	69
Assenza di crescita	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0
Inquinamento	0	0	0	0	0	50	0	75	0	6	0	0

TABELLA III

Confronto tra l'azione di 4 diverse diluizioni di Bactofen[®], 1 di cloruro di benzalconio (aggiunte in parti uguali ad escreti fluidificati) ed 1 di Desogen i[®] (impiegato secondo la tecnica di routine nel nostro laboratorio) su escreti aventi batterioscopico negativo ma con precedenti positivi. N° delle prove: per Bactofen[®] 0,02% e 0,01% n° 4; per Bactofen[®] 0,2% n° 16; per Bactofen[®] 0,1%, cloruro di benzalconio e Desogen i[®] n° 20.

Risultato della coltura	Bactofen [®] 0,2% %	Bactofen [®] 0,1% %	Bactofen [®] 0,02% %	Bactofen [®] 0,01% %	Cloruro di benzalconio %	Desogen i [®] %
Positivo	13	30	0	0	20	10
Negativo	87	70	75	75	80	90
Inquinato	0	0	25	25	0	0

L'efficacia decontaminante, a proposito della quale già dalle prove appena citate riportate nelle Tabelle II e III si possono ricavare alcune indicazioni, è stata inoltre verificata direttamente su campioni di escreato con batterioscopico positivo (Tab. IV) anche in relazione a variazioni del tempo di contatto (Tab. V).

TABELLA IV

Confronto tra l'azione (tempo di contatto 2 h) di tre diverse diluizioni di Bactofen[®], una di cloruro di benzalconio ed una di Desogen i[®] su n° 11 escreti con batterioscopico positivo (il Desogen i[®], a differenza degli altri composti di ammonio quaternario, è stato aggiunto in quantità uguale al solo escreato, anziché a quella dell'escreato + fluidificante, ed è stato tenuto in contatto per 12 h).

Risultato della coltura	Bactofen [®] 0,1% %	Bactofen [®] 0,02% %	Bactofen [®] 0,01% %	Cloruro di benzalconio %	Desogen i [®] %
Positivo	64	36	18	64	55
Negativo	18	0	9	9	45
Inquinato	18	64	73	27	0

TABELLA V

Confronto tra l'azione di due diverse diluizioni di Bactofen[®], una di cloruro di benzalconio ed una di Desogen i[®], anche in rapporto al variare del tempo di contatto, su 26 escreti con batterioscopico positivo (le prove con tempo di contatto di 15 min sono limitate a n° 5 escreti).

Risultato della coltura	Tempo di contatto	Bactofen [®] 0,2% %	Bactofen [®] 0,1% %	Cloruro di benzalconio %	Desogen i [®] %
Positivo	15 min	60	20	0	60
	30 min	69	61	35	73
	1 h	72	72	60	68
	2 h	76	70	61	73
Negativo	15 min	20	20	20	20
	30 min	12	4	4	8
	1 h	16	4	0	16
	2 h	12	15	12	15
Inquinato	15 min	20	60	80	20
	30 min	19	35	61	19
	1 h	12	24	40	16
	2 h	12	15	27	12

La lettura dei terreni di Lowenstein Jensen inoculati è stata eseguita settimanalmente registrando il numero delle colonie quando questo era ≤ 100 e considerando confluyente la crescita quando si superavano le 100 U. Per i terreni in cui il numero delle colonie era contabile (≤ 100) la lettura veniva ripetuta la settimana successiva e, nel caso che non avesse subito cambiamenti, veniva considerata definitiva. Ugualmente definitiva è stata considerata la lettura eseguita dopo 40 giorni dall'inoculo di tutti i terreni positivi che non erano apparsi tali nelle settimane precedenti.

I Lowenstein Jensen inquinati sono stati registrati durante le letture settimanali e scartati. Per i terreni negativi, l'incubazione è stata prolungata fino al 60° giorno, dopo di che sono stati registrati come tali.

RISULTATI

Dai dati raccolti nella Tabella I, dedotti dalle prove eseguite per evidenziare l'eventuale azione lesiva del Bactofen® e del cloruro di benzalconio, nessuno dei due composti di ammonio quaternario sembrerebbe influire sullo sviluppo delle colonie di Micobatteri. Soltanto il III° stipite si differenzia dagli altri: infatti mentre la sospensione intera ha dato in rapporto ai controlli un 100 % di sviluppo di colonie dopo il contatto con i vari decontaminanti, dopo un analogo trattamento la sua diluizione 10^{-3} ha fatto registrare una riduzione di tale percentuale e la 10^{-5} è risultata addirittura sterile.

Nella valutazione di un tale risultato deve essere tenuta presente l'approssimatività delle diluizioni anche se ottenute da sospensioni batteriche standardizzate, tanto che sui terreni inoculati con la sospensione di controllo 10^{-5} sono cresciute soltanto tre colonie, numero talmente basso da rendere pressoché irrilevante l'assenza di crescita dopo il trattamento con le varie sostanze saggiate. Una conferma di tale impossibilità di allestire inoculi ad identica carica batterica risulta evidente anche in tutti quei casi in cui sono cresciute paradossalmente più colonie sui terreni inoculati con sospensioni trattate che sui controlli (ciò non risulta dalla Tabella I, poiché ovviamente in tali frangenti la proporzione tra le colonie sviluppatesi dopo e prima della decontaminazione è stata tabulata come 100 %).

La bassa o assente lesività delle tre diluizioni di Bactofen® e del cloruro di benzalconio trova conferma nei risultati del secondo gruppo di prove (Tab. II) con la sola eccezione, da considerarsi casuale, di una coltura trattata con cloruro di benzalconio.

Dal confronto quantitativo dell'entità di crescita ottenuta in terreni inoculati in parallelo con sospensioni standardizzate di bacilli tubercolari diluite 1:10 rispettivamente in soluzione fisiologica ed in un pool di escrea-

La lettura dei terreni di Lowenstein Jensen inoculati è stata eseguita settimanalmente registrando il numero delle colonie quando questo era ≤ 100 e considerando confluyente la crescita quando si superavano le 100 U. Per i terreni in cui il numero delle colonie era contabile (≤ 100) la lettura veniva ripetuta la settimana successiva e, nel caso che non avesse subito cambiamenti, veniva considerata definitiva. Ugualmente definitiva è stata considerata la lettura eseguita dopo 40 giorni dall'inoculo di tutti i terreni positivi che non erano apparsi tali nelle settimane precedenti.

I Lowenstein Jensen inquinati sono stati registrati durante le letture settimanali e scartati. Per i terreni negativi, l'incubazione è stata prolungata fino al 60° giorno, dopo di che sono stati registrati come tali.

RISULTATI

Dai dati raccolti nella Tabella I, dedotti dalle prove eseguite per evidenziare l'eventuale azione lesiva del Bactofen® e del cloruro di benzalconio, nessuno dei due composti di ammonio quaternario sembrerebbe influire sullo sviluppo delle colonie di Micobatteri. Soltanto il III° stipite si differenzia dagli altri: infatti mentre la sospensione intera ha dato in rapporto ai controlli un 100 % di sviluppo di colonie dopo il contatto con i vari decontaminanti, dopo un analogo trattamento la sua diluizione 10^{-3} ha fatto registrare una riduzione di tale percentuale e la 10^{-5} è risultata addirittura sterile.

Nella valutazione di un tale risultato deve essere tenuta presente l'approssimatività delle diluizioni anche se ottenute da sospensioni batteriche standardizzate, tanto che sui terreni inoculati con la sospensione di controllo 10^{-5} sono cresciute soltanto tre colonie, numero talmente basso da rendere pressoché irrilevante l'assenza di crescita dopo il trattamento con le varie sostanze saggiate. Una conferma di tale impossibilità di allestire inoculi ad identica carica batterica risulta evidente anche in tutti quei casi in cui sono cresciute paradossalmente più colonie sui terreni inoculati con sospensioni trattate che sui controlli (ciò non risulta dalla Tabella I, poiché ovviamente in tali frangenti la proporzione tra le colonie sviluppatesi dopo e prima della decontaminazione è stata tabulata come 100 %).

La bassa o assente lesività delle tre diluizioni di Bactofen® e del cloruro di benzalconio trova conferma nei risultati del secondo gruppo di prove (Tab. II) con la sola eccezione, da considerarsi casuale, di una coltura trattata con cloruro di benzalconio.

Dal confronto quantitativo dell'entità di crescita ottenuta in terreni inoculati in parallelo con sospensioni standardizzate di bacilli tubercolari diluite 1:10 rispettivamente in soluzione fisiologica ed in un pool di escrea-

ti negativi fluidificati risulta, inoltre, evidente l'azione protettiva esercitata dall'escreato sui Micobatteri nei confronti di tutte le sostanze impiegate, il che riduce ulteriormente, in un eventuale impiego pratico, il rischio di lesività.

I dati raccolti nella Tabella III relativi a prove eseguite su escreti con esame batterioscopico negativo evidenziano che anche Micobatteri che, quando erano presenti (ma la maggior parte degli escreti erano evidentemente negativizzati), erano a carica molto bassa e per giunta a vitalità ridotta, provenendo da pazienti tubercolari lungamente trattati, resistono all'azione dei vari decontaminanti alle concentrazioni saggiate e sono successivamente capaci di crescere nelle colture.

Esaminando poi l'efficacia dell'azione decontaminante delle sostanze impiegate sulla flora batterica associata risulta subito evidente (Tabb. II, III e IV) l'impossibilità dell'impiego delle diluizioni di Bactofen[®] allo 0,02 % e allo 0,01 %, a causa dell'alta percentuale di inquinamenti per giunta non accompagnata, come mostrano nella Tabella II i dati relativi alle sospensioni batteriche in soluzione fisiologica, da minor lesività rispetto alle soluzioni più concentrate.

Dal confronto tra le rimanenti diluizioni di Bactofen[®] ed il cloruro di benzalconio (Tabb. II, III, IV e V) non emergono che limitate differenze di azione decontaminante e di lesività mentre il Desogen i[®] allo 0,5 %, particolarmente laddove è stato impiegato con tempo di contatto di 12 ore, è apparso nettamente più lesivo.

Sarà utile a questo punto ricordare che, mentre le prime prove, i cui dati sono esposti nelle Tabelle I e II, sono state eseguite da colture e quindi con Micobatteri sicuramente vitali, in tutte le successive sono state utilizzati escreti con cariche batteriche evidentemente variabili ed a vitalità ignota; fatto questo che spiega la maggiore incidenza in questo secondo gruppo di prove di colture negative.

Nella ricerca del tempo di contatto ottimale, che nelle prove è stato fatto oscillare tra 15 minuti e 120 minuti, non si sono registrate influenze sulla positività delle colture collegate con tali variazioni (Tab. V).

Evidente è invece l'influenza del tempo di contatto (Tab. V) sulla riduzione degli inquinamenti specialmente per quanto si riferisce al Bactofen[®] allo 0,1 % e al cloruro di benzalconio, molto meno per il Bactofen[®] allo 0,2 % ed il Desogen i[®]; evidentemente i decontaminanti più concentrati (Bactofen[®] 0,2 % ed il Desogen i[®]) agiscono sulla flora associata distruggendola in tempi brevissimi mentre per gli altri occorre che l'azione venga prolungata.

Dal confronto, eseguito contando il numero delle colonie delle varie colture positive ottenute da ciascun campione con diversi tempi di con-

TABELLA VI

Incidenza del tempo di contatto sulla vitalità dell'inoculo (le percentuali relative alla variazione del tempo di contatto da 15 a 30 min sono state calcolate su 60 campioni; tutte le altre su 144 campioni).

Variazioni del tempo di contatto		Percentuale dei casi in cui con l'aumento del tempo di contatto si sono avute variazioni del n° delle colonie sviluppatesi		Percentuale dei casi in cui con l'aumento del tempo di contatto <i>non</i> si sono avute variazioni del n° delle colonie sviluppatesi	Percentuale dei casi in cui non si è potuto fare il confronto a causa di inquinamenti in una delle due prove
da	a	>	<		
15 min	30 min	22	15	54	9
30 min	1 h	17	8	62	13
1 h	2 h	10	17	63	10

tatto (Tab. VI) sono emerse soltanto variazioni casuali evidentemente legate all'impossibilità di avere un inoculo identico per tutti i terreni di coltura.

DISCUSSIONE

La conclusione che appare più evidente è che non esistono motivi che consiglino per la decontaminazione dell'escreato l'impiego del Bactofen® in sostituzione del Desogen i®.

Una analoga considerazione non può essere fatta invece per il cloruro di benzalconio che ha fatto registrare un'alta incidenza di inquinamenti, almeno nella tecnica semplificata in cui è stato da noi usato.

Per quanto riguarda la concentrazione di Bactofen® più idonea la scelta è evidentemente ristretta a quelle allo 0,2 % ed allo 0,1 %; tra queste ci è sembrata da preferire la prima per la quale una possibile maggiore lesività (peraltro non rilevabile dai dati raccolti) è ampiamente compensata dalla riduzione del numero degli inquinamenti; a tale proposito non sarà superfluo sottolineare che le più alte percentuali di positività dei colturali (Tabb. II e V) si raggiungono tra i materiali decontaminati con il Bactofen® allo 0,2 % seguito da Desogen i®, Bactofen® allo 0,1 % ed, a molte lunghezze, dal cloruro di benzalconio.

Riguardo ai tempi di contatto, se si escludono quelli inferiori a 30 minuti, non sono emersi dati tali da orientare le preferenze verso 30, 60 o 120 minuti; considerando tuttavia la loro scarsa, od addirittura nulla, influenza sulla vitalità dell'inoculo ci è parso offrire maggiori garanzie un tempo di 120 minuti che cautelasse le colture dagli inquinamenti da parte degli stipiti più resistenti.

CONCLUSIONI

Da tutto quanto sopra esposto non si vuol certo dedurre che la decontaminazione con Bactofen® secondo la tecnica da noi impiegata sia attualmente il meglio per la ricerca colturale del bacillo di Koch: ulteriori prove sarebbero infatti necessarie per una migliore messa a punto del metodo e per evidenziare eventuali controindicazioni relative all'impiego del Bactofen® come decontaminante, ad esempio su materiali diversi dall'escreato (in primo luogo le urine) o su Micobatteri diversi da *M. tuberculosis*.

Ci sembra tuttavia che questo sistema, che essendo semplificato si presta particolarmente all'impiego in quei laboratori che eseguono esami su vasta scala (nel nostro caso la media giornaliera delle richieste non scende quasi mai al di sotto delle 20 unità), non comporti un rischio di errore, cioè di false negatività di colturali eseguiti da escreti a bassa carica batterica o con bacilli scarsamente vitali, intollerabile.

* * *

BIBLIOGRAFIA

- 1 - GOETH H., MÜLLER E. e SCHEFFLER H. — Le proprietà antibiotiche del dodecildi-(beta-ossietil)-benzilammonio cloruro. *Arzneimittelforsch.*, **9**, 622, 1959.
- 2 - KLEEBERG H. H. — La décontamination des expectorations et la préservation de *Mycobacterium tuberculosis* par le désogèn-pancréatine. *Bull. Un. Int. c. Tub.*, **38**, 72, 1966.
- 3 - KRASNOW I. and WAYNE L. G. — Sputum digestion. I. The mortality rate of tubercle bacilli in various digestion systems. *Am. J. Clin. Path.*, **45**, 352, 1966.
- 4 - KUBICA G. P., KAUFMAN A. J. and DYE W. E. — Comments on the use of the new mucolytic agent N-acetyl-L-cysteine as a sputum digestant for the isolation of Mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **89**, 284, 1964.
- 5 - MANDLER F. e CORNIA G. — Valutazione sull'impiego della N-acetil-L-cisteina e dell'alfa (p-tolil)-dodecil-trimetilammonioossimetilsolfato [Desogen] in paragone alle tecniche convenzionali quale metodo di isolamento dei Micobatteri. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.*, **46**, 426, 1967.

- 6 - MEISSNER G. und TUNCMAN S. — Vorbehandlung von Sputum und Magenspülwasser mit Pankreatin-Desogen-Lösung nach Saxholm zur Züchtung von Tuberkelbakterien. *Beitr. Klin. Tuberk.*, **126**, 65, 1962.
 - 7 - PATTERSON R. A., THOMSON T. L. and LARSEN D. H. — Use of zephiran in isolation of *M. tuberculosis*. - *Am. Rev. Tub.*, **74**, 284, 1956.
 - 8 - PISANO A., MATTINA R., BENANTI S. e NICOLETTI G. — Il dodecil-di-(beta-ossietil)-benzilammonio cloruro. *Antibiotica*, **9**, 188, 1971.
 - 9 - SAXHOLM R. — An experimental investigation of method for the cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum. *Oslo Univ. Press*, Oslo, 1, 1958.
 - 10 - VIALIER J. — Traitement par les ammoniums quaternaires des produits pathologiques pour l'isolament du bacille tuberculeux. *Ann. Biol. Clin.*, **14**, 722, 1956.
 - 11 - VIALIER J., BIOT N. et AUGAGNEUR J. — Résultats de l'isolament du bacille tuberculeux à partir de produits pathologiques par l'emploi de sels d'ammonium quaternarie. *Ann. Biol. Clin.*, **16**, 505, 1958.
-