

DIFFUSIONE DI OLI ESSENZIALI PER IL CONTROLLO DEL MICROBIOTA AMBIENTALE

* Fabrizio Gelmini, ** Luciano Belotti, *** Cristian Testa, * Giangiacomo Beretta

La gestione della contaminazione microbica ambientale rappresenta un problema di particolare gravità per gli ambienti comunitari, in particolare per le strutture nosocomiali e di lunga degenza. La vaporizzazione degli oli essenziali (OE), noti agenti antimicrobici, potrebbe rappresentare un valido strumento per la riduzione di questo tipo di contaminazione. Scopo di questo studio è stato quindi quello di valutare l'efficacia della nebulizzazione di una miscela selezionata di OE nel ridurre la contaminazione microbica nelle stanze di degenza di una struttura di Residenza Sanitaria Assistenziale (RSA).



Un'adeguata disinfezione delle superfici ospedaliere contaminate da micro-organismi ambientali può eliminare, o ridurre, l'insorgenza di patologie trasmissibili attraverso micro-organismi patogeni. A causa della presenza di numerosi ceppi patogeni multi-resistenti (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Candida spp.*, *Acinobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*), l'impiego delle convenzionali procedure di sanificazione (composti all'ossigeno attivo, ipoclorito, sali d'ammonio quaternari, ecc.) potrebbe non mostrarsi efficace nel garantire la loro eradicazione¹.

Tra le strategie complementari all'impiego dei convenzionali agenti disinfettanti, l'impiego degli oli essenziali (OE) rappresenta una nuova frontiera in termini di sicurezza, di efficacia e di compliance dei pazienti.

Il potenziale antimicrobico degli OE è stato ampiamente valutato attraverso molteplici studi *in vitro*, che stabiliscono la loro attività inibitoria contro la crescita di lieviti, miceti, batteri patogeni, come recentemente ed esaurientemente riportato da Lang e Buchbauer, e da Seow e collaboratori^{2,3}.

Una serie di Autori ha inoltre valutato l'efficacia antimicrobica degli OE utilizzati in aerosol dispersione: Inouye e collaboratori hanno investigato l'attività antimicrobica degli OE contro micro-organismi dell'apparato respiratorio, esponendo i terreni di coltura di micro-organismi patogeni a OE vaporizzati, di diversa origine botanica. Questi Autori hanno dimostrato che la crescita di *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*

ed *Escherichia coli*, viene inibita dalla nebulizzazione di OE in concentrazione compresa tra 1.56-1600 mg_{OE}/L_{aria}, in relazione all'origine botanica dell'OE impiegato⁴. Similmente, Hood e collaboratori hanno dimostrato l'efficacia dell'OE di *Leptospermum petersonii* nell'inibire *in vitro* la crescita del fungo *Aspergillus fumigatus* e *in vivo* nell'eradicarlo dai polmoni di topi BALB/c immunodepressi infettati, sempre mediante aerodispersione⁵. Recentemente, inoltre, Laird e collaboratori hanno dimostrato che la vaporizzazione di OE di *Citrus limon* è efficace nel ridurre la contaminazione ambientale da *S. aureus* e *Enterococchi* sulle superfici metalliche⁶, mentre Ali *et al.* riportavano che i componenti vaporizzati dell'OE di lemongrass impediscono la crescita di miceli e la germinazione

di conidi di *Colletotrichum gloesporioides*, l'agente patogeno responsabile dell'antracnosi nei frutti di papaya⁷.

Questi risultati sottolineano le potenzialità dell'aerodispersione di OE come mezzo potente ed efficace nel controllo dei patogeni ambientali.

Nonostante i lavori citati, non esistono a oggi evidenze riportate in letteratura sulla valutazione dell'efficacia dell'aero dispersione degli OE, associata o meno ai normali protocolli standard di pulizia, sulla riduzione delle cariche microbiche ambientali in strutture di lungo degenza o di residenza sanitaria assistenziale (RSA).

Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di valutare l'efficacia antimicrobica di una miscela aero dispersa di OE selezionati nel ridurre le cariche microbiche ambientali in una struttura di residenza sanitaria assistenziale. La miscela di OE è stata applicata in forma di aerosol acquoso nebulizzato per mezzo di diffusori a ultrasuoni, in modo da (i) evitare riscaldamento dei terpeni e (ii) raggiungere la distribuzione dei terpeni più omogenea possibile sulle superfici delle stanze di degenza. Oltre a questa valutazione, abbiamo ritenuto opportuno considerare anche le eventuali ripercussioni della vaporizzazione degli OE sulle prescrizioni di specifiche classi di farmaci ai degenti dell'RSA e sulla durata delle terapie eventualmente adottate.

Materiali e metodi

Pazienti e localizzazione della struttura residenziale

Lo studio è stato condotto presso la fondazione R.S.A. "Don Ambrogio Cacciamatta", una struttura di lungo degenza con 114 posti letto presso il lago di Iseo (BS). La planimetria della struttura, che copre una superficie approssimativa di 1060 m², è riportata in Fig. 1 ed è costi-

tuita da due piani che sono stati utilizzati come nucleo di trattamento e nucleo di controllo. I soggetti degenti nei due nuclei erano uniformi per numerosità, età, genere e patologie. Seguendo le procedure interne di assistenza sanitaria, l'arruolamento ha coinvolto degenti che all'ammissione non erano affetti o in trattamento per nessuna patologia cronica o infettiva dell'apparato respiratorio. Prima dell'ospedalizzazione, tutti i degenti esposti al trattamento, o i loro tutori legali, hanno fornito un modulo di consenso scritto.

Diffusione degli oli essenziali

La miscela di OE è stata dispersa utilizzando diffusori a ultrasuoni disponibili in commercio (md. Rondó, Gisa s.r.l., Romentino, Novara). I diffusori venivano riempiti con acqua (500 mL) e 100 µL di una miscela di oli essenziali (0.02% vol/vol) e programmati per una nebulizzazione notturna della durata di 8h, per tutta la durata dello studio.

Durante le ore diurne, le stanze venivano lasciate aperte, permettendo la circolazione dell'aria attraverso tutti gli ambienti del nucleo trattato (stanze e corridoi).

Analisi gas-cromatografica

L'analisi GC-MS è stata eseguita per mezzo di un gas-cromatografo Bruker Scion SQ, equipaggiato con detector di massa SQ (singolo quadrupolo). In Fig. 2 sono riportati i profili terpenici della miscela utilizzata (A) e quello della miscela aero dispersa all'uscita del nebulizzatore (B): quest'ultima è stata raccolta mediante gorgogliamento in un apposito *device* contenente diclorometano, e analizzata nelle stesse condizioni di analisi della miscela originaria.

Campioni biologici e analisi

Le conte microbiche sono state effettuate utilizzando piastre da contatto Hyecheck™ "Total Count" e Hyecheck™ "yeast and mold". Brevemente, ogni piastra è stata posta in contatto con le



Fig. 1. Planimetria della R.S.A. "Don Ambrogio Cacciamatta"

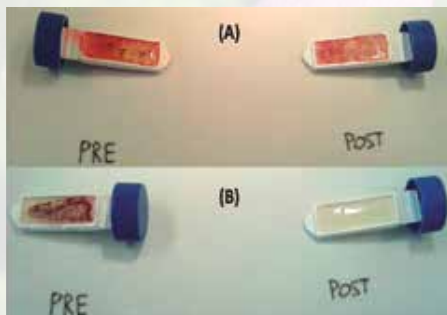


Fig. 2. Profilo GC-MS (A) della miscela originale di oli essenziali e (B) dei componenti estratti dalla nebulizzazione di OE/acqua in aerosol. I maggiori picchi identificati sono: santene (5.37 min), α -pinene (6.87 min), camphene (7.43 min), β -pinene (8.40 min), β -mircene (8.82 min), ciclofenchene (9.55 min), *p*-cimene (10.24 min), eucaliptolo (10.54 min), β -ocimene (11.10 min), γ -terpinene (11.60 min), terpinolene (12.76 min), β -linalool (13.50 min), isomentone (16.34 min), endo-borneolo (16.68 min), *L*-terpinen-4-olo (17.05), α -terpineolo (17.74 min), β -citronellolo (19.16 min), linalile acetato (20.10 min), trans-geraniolo (20.22 min), citronellolo acetato (25.74 min), bornile acetato (21.63 min), geranile acetato (25.74 min), β -cariofillene (27.33 min), α -muurolene (28.25min), β -farnesene (28.76 min).

superfici selezionate e immediatamente posta in incubatore per 120h per le conte batteriche e 24h per quelle fungine ($T = 37^\circ\text{C}$). Il numero delle colonie sviluppate è stato quindi sottoposto a conta. Questo protocollo, convenzionale e standardizzato, permette il rilevamento dei più comuni micro-organismi ambientali, con selettività per *Enterococcus faecalis* (Gram-positivo), *E. coli* (Gram-negativo), *Proteus vulgaris* (Gram-negativo), *Salmonella typhimurium* (Gram-negativo), *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo), *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*. Le misure sono state svolte in triplicato e i risultati espressi come media \pm deviazione standard (colonie/cm²).

Protocollo di sanificazione standard e miscela di oli essenziali utilizzati

All'interno della RSA, la detergenza convenzionale degli utensili veniva effettuata con sali d'ammonio quaternario; le miscele per i lavaggi delle mani contenevano detergenti anioni-

ci, non ionici, anfoteri, resine poliamminiche e agenti antifertmentativi; la detergenza e la disinfezione delle superfici veniva effettuata con due tipologie di prodotti contenenti i) acido fosforico (15-25%), alchilalcoli etossilati (0-5%), detergenti non ionici (5-15%) (Kaltol, Italchim, Bologna) e ii) detergenti non ionici (5-15%), detergenti cationici, 2-butossietanolo, dopo diluizione di 50 g in 10 L di acqua.

La composizione della miscela di oli essenziali utilizzata era così composta: *Lavandula angustifolia* 24% (w/w), *Melaleuca cajuputi* 24% (w/w), *Abies sibirica* 20% (w/w), *Myrtus communis* 20% (w/w) e *Pelargonium graveolens* 12% (w/w). I livelli di contatto con la pelle dei potenziali allergeni umani per gli OE di *L. angustifolia* e *P. graveolens* sono stati classificati ++, in accordo con la *Opinion on Fragrance Allergens in Cosmetic Products* dello *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCSS) della Commissione Europea (EC). (https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/scs_o_073.pdf).

Disegno sperimentale

I nebulizzatori sono stati collocati in n=2 delle 8 stanze collocate al primo piano della struttura di degenza. Il secondo piano, con identica planimetria, è stato utilizzato come nucleo di controllo e sottoposto alle sole procedure di detergenza e disinfezione convenzionali. Le conte microbiche sono state effettuate ogni 30 gg per n=5 mesi ($T_0 =$ baseline; $T_1 = 30_{\text{mo}}$ giorno; $T_2 = 60_{\text{mo}}$ giorno; $T_3 = 90_{\text{mo}}$ giorno; $T_4 = 120_{\text{mo}}$ giorno e $T_5 = 150_{\text{mo}}$ giorno) da novembre 2014 a marzo 2015 in n=5 punti di campionamento randomizzato differenti all'interno della stessa stanza (su superficie di tavolini e armadi) e nei corridoi (corrimano). Al fine di valutare la carica microbica di partenza, ed evitare potenziali effetti antimicrobici

non derivanti dal trattamento previsto, al T_0 e durante i 30 gg di sospensione (da T_4 a T_5) i vaporizzatori non sono stati attivati. Gli OE sono stati quindi diffusi come descritto, senza alcuna modifica rispetto al protocollo giornaliero di pulizia e detergenza degli ambienti impiegato nel nucleo di controllo.

Risultati

Composizione della miscela originale e nebulizzata di OE

I cromatogrammi riportati in Fig. 2 mostrano che il profilo fitochimico della miscela di terpeni recuperata dall'aerosol vaporizzato attraverso i nebulizzatori (pannello superiore) è sovrapponibile a quello della miscela analizzata direttamente (pannello inferiore). Questi risultati dimostrano che la nebulizzazione a ultrasuoni permette di incorporare i terpeni degli OE all'interno di un aerosol acquoso in modo indipendente dalla loro polarità e dal punto di ebollizione. In accordo con l'SCSS della EC, gli allergeni da contatto identificati nella miscela sono tutti classificabili di livello basso: α - e β -pinene ++; terpinolene +; canfora +; β -citronellolo ++; β -linalolo ++; linalile acetato +; β -cariofillene ossido +. Solo il potenziale allergenico del trans-geraniolo è considerato di particolare attenzione (+++).

Conte batteriche, fungine e di lieviti durante il periodo di studio

In Fig. 3 viene riportata una rappresentazione fotografica dello sviluppo di colonie sulle piastre Hychek™ "Total Count". Già a una prima osservazione visuale, si evince che i protocolli di sanificazione che prevedono l'impiego dei soli metodi convenzionali non hanno alcun effetto sulla presenza di colonie batteriche (Fig. 3a).

In Fig. 4 sono invece riportati gli andamenti nel tempo delle cariche microbiche (batteri, funghi

e lieviti) osservate nei punti di campionamento (tavolini, armadi, corrimano) prima dell'inizio del trattamento, durante il trattamento e nel periodo di sospensione finale (dal T₄ al T₅). I livelli di contaminazione batterica più alti sono stati identificati sulla superficie dei tavolini (100-200 colonie/cm²); le superfici degli armadi mostravano una contaminazione di 10-30 colonie/cm², mentre quelle dei corrimani di 30-80 colonie/cm².

A seguito dell'esposizione all'aerosol con OE, sulle superfici del nucleo trattato è stata osservata una stabile riduzione delle cariche microbiche fino al quarto mese di trattamento (tavolini >90%, P<0.001; superfici degli armadi >75%, P< 0.001, Fig. 4), rispetto alle stanze sottoposte alla sola sanificazione standard. Un mese dopo la sospensione del trattamento con OE aero-dispersi, i livelli di contaminazione microbica nelle stanze trattate sono tornati ai livelli misurati nelle stanze di controllo, confermando che l'attività antimicrobica osservata non era dovuta a fattori ambientali esterni. A differenza delle misurazioni effettuate su tavolini e armadi all'interno delle stanze, quelle condotte sui corrimani dei corridoi esterni (in entrambe i nuclei, di trattamento e di controllo), non hanno mostrato differenze statisticamente significative nella media delle conte microbiche. Questo dimostra, molto verosimilmente, che l'abbassamento della percentuale di terpeni nell'aria, a opera della loro diluizione, riduce il potere di inibire la crescita microbica.

Farmaci somministrati durante il periodo di trattamento

In Tab. 1 sono riportate le classi di farmaci somministrati secondo prescrizione medica al totale dei degenti dei due nuclei e i relativi giorni di trattamento terapeutico, per trattare patologie per lo più a carico del sistema respira-

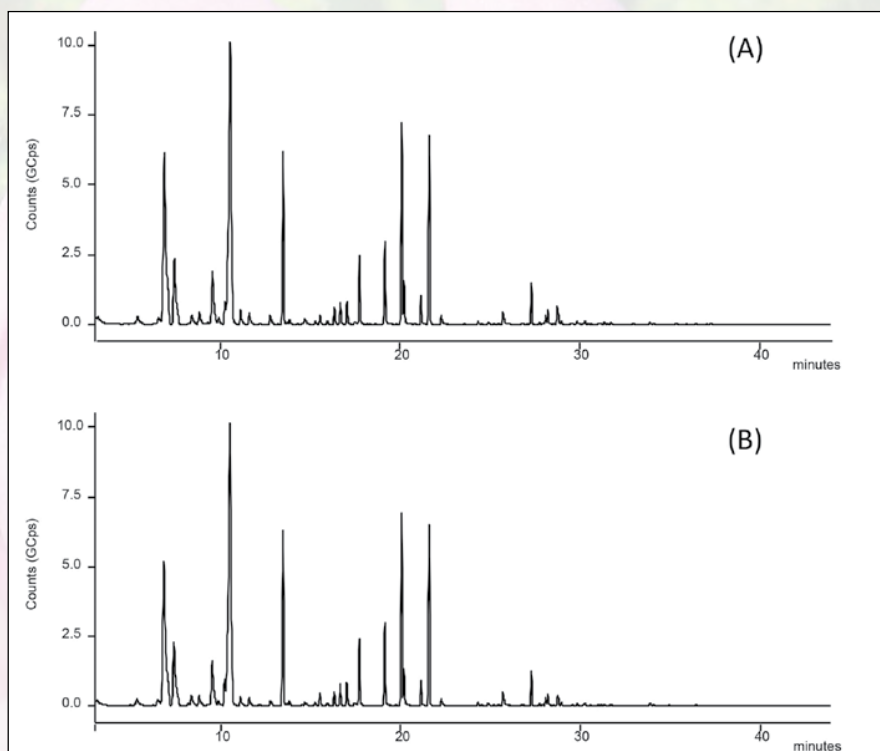


Fig. 3. Rappresentazione visuale dello sviluppo di colonie batteriche su piastre da contatto dopo l'esposizione alle superfici dei tavolini, prima (sinistra) e dopo (destra) la sanificazione con le convenzionali procedure (a) o con gli oli essenziali aero dispersi associati alle convenzionali procedure di sanificazione (b).

torio e insorte durante il periodo dello studio (n= 120 giorni). Come atteso, quella degli antibiotici é stata la classe di farmaci maggiormente prescritta, con un totale di n=26 prescrizioni e di n=102 giorni di trattamento farmacologico. A seguire, la seconda classe di farmaci prescritta è stata quella dei mucolitici (n=14 prescrizioni, 84 giorni di trattamento terapeutico), seguita da broncodilatatori (n=7 prescrizioni, 52 giorni di trattamento), FANS (n=3 prescrizioni, 7 giorni di trattamento) e corticosteroidi (n=6 prescrizioni, 3 giorni di trattamento).

Considerando invece il numero di prescrizioni di farmaci e i giorni di trattamento all'interno dei due nuclei (Tab. 1), risulta evidente come nel nucleo trattato con oli essenziali, vi sia stata una significativa riduzione sia del numero di prescrizioni (-80%) che di durata dei trattamenti farma-

cologici (-86%) somministrati ai degenti.

Discussione

In questo lavoro è stata valutata l'efficacia igienizzante di una miscela aero dispersa di oli essenziali contro i micro-organismi presenti in un nucleo di una struttura sanitaria per lungo degenti. I risultati mostrano innanzitutto che l'utilizzo di diffusori a ultrasuoni permette una dispersione dei terpeni degli oli essenziali che rispetta la percentuale in cui essi sono presenti nella miscela originaria, indipendentemente dalla loro polarità o dal loro punto di ebollizione, permettendo così una diffusione di un vapore olio/acqua con composizione costante. Va osservato che questa nebulizzazione è molto diversa da quella ottenibile con i normali vaporizzatori termici, i quali inducono una dispersione prima delle componenti più volatili e

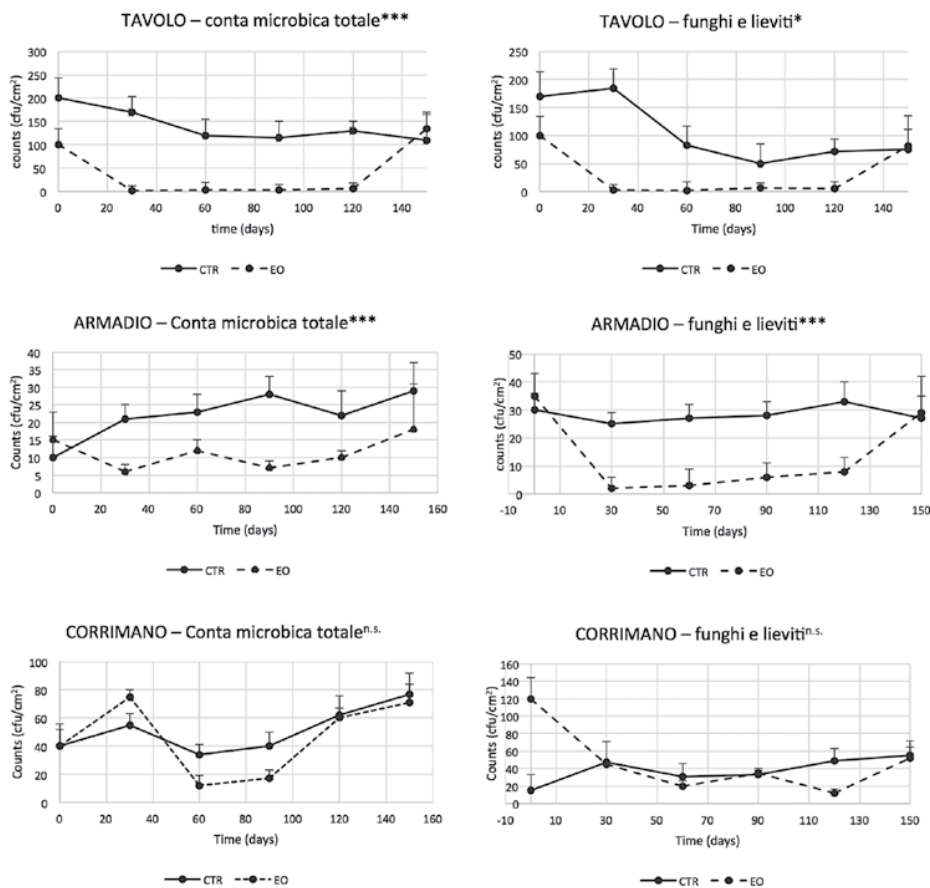


Fig. 4. Andamento tempo-dipendente delle popolazioni microbiche ambientali osservate nelle stanze dell' nucleo controllo (CTR, linea continua) e di trattamento (EO, linea punteggiata). La vaporizzazione degli OE è stata sospesa al 120° giorno. Gli asterischi indicano il livello di significatività statistica tra le conte microbiche medie del gruppo controllo (CTR) contro il gruppo trattato (T) con OE (valori monitorati dal 30° al 120° giorno). * $P < 0.05$, *** $P < 0.005$, n.s. non significativo (Student's T-test).

meno idrofile, e successivamente di quelle a punto di ebollizione crescente o con maggiore idrofilia. Nel valutare le cariche microbiche, sono state scelte delle piastre da contatto, già utilizzate in letteratura per valutare la contaminazione di batteri meticillino- e vancomicina-resistenti negli ambienti ospedalieri⁸ oppure per monitorare la crescita batterica aerobica e i bacilli Gram-negativi enterici dei polli all'interno della Stazione Spaziale Internazionale^{9,10}.

Tra i batteri Gram-positivi e Gram-negativi rilevabili attraverso queste piastre, ci sono molte specie coinvolte nella trasmissione di patologie che affliggono i degenti di ospedali e di case di cura, in particolare quelle a lunga degenza per grandi anziani. *E. faecalis*, per esempio,

è associato alle infezioni nosocomiali e identificato nelle radici dei denti durante i trattamenti del canale dentale. *E. coli* può essere trasmesso a seguito di contaminazione fecale, *P. vulgaris*, anch'esso da contaminazione fecale, è una causa comune di infezione delle ferite e del tratto urinario, in particolare durante i periodi di lunga ospedalizzazione, mentre *S. aureus* è una diffusa causa di infezione della pelle e del tratto respiratorio. Similmente, *S. typhimurium*, benché non considerato generalmente un contaminante ambientale, è stato identificato come la causa di numerose infezioni di salmonella dopo la degenza in strutture ospedaliere¹¹.

Per quanto concerne invece muffe e lieviti, la selettività delle piastre utilizzate riguarda, tra le

specie d'interesse, *C. albicans* (nota per causare infezioni orali e del tratto uro-genitale), *A. niger* (l'agente eziologico dell'aspergillosi) e *S. cerevisiae* (talvolta implicato nelle coliti ulcerose).

I nostri risultati presentano una evidente correlazione tra le manifestazioni infettive, i problemi infiammatori nei degenti e la presenza di micro-organismi contaminanti ambientali. L'esposizione delle superfici all'azione della miscela utilizzata di oli essenziali aero dispersi induce una drastica riduzione (in alcuni casi vicino alla completa eradicazione) della contaminazione microbica ambientale e, di conseguenza, una riduzione delle infezioni trasmissibili, con una concomitante diminuzione dei relativi trattamenti farmacologici e della durata degli stessi.

È importante inoltre sottolineare che la contemporanea riduzione di farmaci somministrati e relativa durata dei trattamenti è stata registrata per tutta la popolazione degente nel nucleo trattato con gli oli essenziali, nonostante i diffusori fossero localizzati solamente in due delle otto stanze presenti nel nucleo.

Quest'evidenza suggerisce fortemente che la dispersione di OE può esercitare un'azione protettiva diretta sull'apparato respiratorio, non legata esclusivamente all'abbattimento delle cariche microbiche ambientali. L'efficacia protettiva sui soggetti degenti nelle stanze adiacenti a quelle in cui avveniva la diffusione, comparata alla mancata attività antimicrobica valutata sui corridoi esterni alle stanze, può essere spiegata in termini di esposizione dei pazienti a una dose accumulabile di terpeni residui e diluiti nell'aria, assorbiti mediante i normali atti respiratori. Questi risultati indicano quindi che l'effetto antimicrobico sul corpo umano risulta apprezzabile anche nei soggetti

nelle cui stanze non è avvenuta la nebulizzazione, probabilmente grazie alla circolazione dell'aria dovuta alle normali attività ospedaliere (durante le quali le porte delle stanze sono mantenute aperte, e i degenti, come il personale, sono liberi di circolare tra i diversi settori), e nonostante la perdita di efficacia di sanificazione lungo i corridoi, dovuta all'eccessiva diluizione dei terpeni nell'aria.

In ogni caso, al fine di chiarire al meglio questo aspetto, si rende necessario un ulteriore approfondimento sperimentale, in considerazione del fatto che le conte microbiche ambientali sono state effettuate solamente nelle stanze in cui sono stati localizzati i diffusori per l'aero dispersione.

È importante inoltre rilevare che non sono stati riportati effetti avversi legati alla diffusione degli OE per tutta la durata dello studio. Questa osservazione risulta in accordo con il basso potenziale allergenico dei singoli componenti della miscela testata.

Tra questi, solo l' α -pinene (0.003%, ++), e il linalile acetato (0.002%, +) superano il limite massimo fissato per i potenziali allergeni nei prodotti cosmetici *stay-on* (0.001%). Va tuttavia considerato che (i) la nebulizzazione di queste sostanze volatili porta a una loro ulteriore diluizione nell'aria, e la loro concentrazione quindi può essere facilmente stimata a livelli inferiori alle parti per bilione (sub-ppb) e che (ii) la diffusione non è stata costante nell'arco della giornata, ma effettuata solamente nelle ore notturne.

In conclusione, i risultati riportati nel presente lavoro sottolineano (i) l'utilità e l'efficacia delle molecole bioattive volatili degli oli essenziali nel controllare e ridurre la contaminazione microbica ambientale nelle strutture comunitarie; (ii) come gli OE possano ridurre gli even-

Farmaci	CTR	giorni	OE	giorni	DPs Δ (%)	Ds (%)
Antibiotici	20	102	6	25	-70	24.5
Mucolitici	14	84	0	0	-100	0
Broncodilatatori	7	52	0	0	-100	0
FANS	3	7	2	4	-33	57.1
Corticosteroidi	6	34	2	10	-77	29.4
Totale	50	275	10	39	-80	-86

Tabella 1. - Numero totale dei farmaci prescritti ai degenti nelle stanze dell'ala controllo (CTR) e trattata (OE) nel periodo dello studio. Antibiotici: sulfametossazolo+trimetoprim (Bactrim®), amoxicillina, levofloxacina, ceftriaxone; mucolitici: acetilcisteina, bromexina; broncodilatatori: salmeterolo xinafoato, FANS: paracetamolo, ketoprofene, ibuprofene; corticosteroidi: fluticasone, betametasone, desametasone.

ti infettivi e la durata dei trattamenti farmacologici nei pazienti soggetti a lungo degenza ospedaliera che, per loro natura, sono esposti a maggior rischio di entrare in contatto con micro-organismi patogeni resistenti.

* UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO; Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali (ESP)
 ** Fondazione "Don Ambrogio Gacciamatta", Iseo (BS)
 *** Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Bergamo

Bibliografia

- Abreu AC, Tavares RR, Borges A, Mergulhão F, Simões M. 2013. Current and emergent strategies for disinfection of hospital environments. *J Antimicrob Chemother* 68: 2718-2732.
- Lang, G., Buchbauer, G. 2012. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flav Fragr J* 27: 13-19.
- Seow, Y.X., Yeo, C.R., Chung, H.L., Yuk, H-G. 2014. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Critic Rev Food Sci Nutr* 54: 625-644.
- Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother* 47: 565-573.
- Hood JR, Burton D, Wilkinson JM, Cavanagh HMA. (2010). Antifungal activity of *Leptospermum petersonii* oil volatiles against *Aspergillus spp.* *in vitro* and *in vivo*. *J Antimicrob Chemother* 65: 285-288.
- Laird K, Armitage D, Phillips C. 2012. Reduction of surface contamination and biofilms of *Enterococcus sp.* and *Staphylococcus aureus* using a citrus-based vapour. *J Hosp Infect* 80: 61-66.
- Ali A, Pheng TW, Mustafa MA. 2015. Application of lemongrass oil in vapour phase for the effective control of anthracnose of 'Sekaki' papaya. *J Appl Microbiol* 118: 1456-1464.
- Squeri R, Grillom OC, La Fauci, V. 2012. Surveillance and evidence of contamination in hospital environment from methicillin and vancomycin-resistant microbial agents. *J Prev Med Hyg* 53: 143-145.
- Castro VA, Thrasher AN, Healy M, Ott CM, Pierson DL. 2004. Microbial Characterization during the Early Habitation of the International Space Station. *Microb Ecol* 47: 119-126.
- Ichida JM, Krizova L, LeFevre CA, Keener HM, Elwell DL, Burt EH. 2001. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J Microbiol Methods* 47:199-208.
- Lee MB, Greig JD. 2013. Review of nosocomial Salmonella outbreaks: infection control interventions found effective. *Public Health* 127: 199-206.