

STIMA DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA *IN VITRO* DI DUE PRODOTTI COMMERCIALI CONTENENTI CLOREXIDINA E OLIO DI *MELALEUCA* SU CEPPI BATTERICI E LIEVITI ISOLATI DA CANI

IN VITRO EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF TWO PRODUCTS CONTAINING CHLORHEXIDINE AND *MELALEUCA* OIL ON BACTERIA AND YEASTS ISOLATED FROM DOGS

PATRIZIA NEBBIA¹, PATRIZIA ROBINO¹, CLARA TRAMUTA¹
MASSIMO BECCATI², ANDREA PEANO¹

¹ Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino

² Libero professionista - Clinica Veterinaria Adda - Capriate San Gervasio (BG)

Riassunto

Introduzione e scopo del lavoro - La terapia topica riveste un ruolo importante nel trattamento delle infezioni cutanee e delle otiti nel cane poiché le concentrazioni antimicrobiche dei principi attivi agiscono direttamente contro i patogeni. Scopo del lavoro è stato valutare l'attività antimicrobica *in vitro* di due prodotti commerciali ad uso veterinario contenenti clorexidina ed essenza di *Melaleuca alternifolia*.

Materiali e metodi - Nello studio sono stati utilizzati diversi ceppi di batteri (*Staphylococcus intermedius*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*) e di lieviti (*Malassezia pachydermatis* e *Candida albicans*) isolati da cani con infezioni cutanee e/o otite. L'attività nei confronti dei microrganismi è stata valutata tramite test a contatto utilizzando 2 prodotti (Diclorex foam[®] e Diclorex oto[®], Candioli Farmaceutici, Italia) tal quali e diluiti. Per confrontare l'azione antibatterica dei due prodotti è stato utilizzato un test non parametrico (Wilcoxon signed rank test).

Risultati e discussione - Entrambi i prodotti si sono dimostrati efficaci nell'azione antimicrobica. Il prodotto ad uso cutaneo ha inibito la crescita batterica entro 1 minuto se usato tal quale e 60 minuti se utilizzato diluito. Il prodotto otologico non diluito è risultato efficace in tempi rapidi (1-5 minuti) verso *S. intermedius*, *E. coli* e un ceppo di *P. aeruginosa* mentre usandolo diluito l'efficacia è risultata inferiore su tutti i batteri. Per i lieviti, solo i prodotti tal quali si sono dimostrati attivi; su *M. pachydermatis* hanno agito entrambi i prodotti, mentre *C. albicans* è stata inibita solo dal preparato otologico.

Summary

Introduction and aim of the study - Topical therapy plays a role in the treatment of skin infections and otitis in the dog because antimicrobial concentrations of the agents come into direct contact with the pathogens. The aim of this study was to analyze *in vitro* the antimicrobial effect of two commercial products containing chlorhexidine and *Melaleuca alternifolia*.

Materials and methods - Bacteria (*Staphylococcus intermedius*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*) and yeasts (*Malassezia pachydermatis* and *Candida albicans*) isolated from dogs with skin diseases and/or otitis externa were used in the study. Antimicrobial activity was evaluated by contact tests using 2 products (Diclorex foam[®] and Diclorex oto[®], Candioli Farmaceutici). The data about antibacterial activity were evaluated by a nonparametric test (Wilcoxon's signed rank test).

Results and discussion - Both products showed to be effective against most microorganisms tested. The dermatological product eliminated all bacteria within 1 minute (non diluted product) and within 60 minutes (1/5 diluted product). The otological product was effective after 1-5 minutes against *S. intermedius*, *E. coli* and 1 strain of *P. aeruginosa*, while its activity was lower against all bacteria when used diluted. As regards yeasts, only non diluted products were effective. Both of them inhibited *M. pachydermatis* growth, while *C. albicans* was inhibited only by the otological product.

INTRODUZIONE

Nel cane le infezioni batteriche e da lieviti che coinvolgono cute e condotto uditivo esterno rappresentano un'evenienza piuttosto comune¹. Queste si possono instaurare senza un'apparente causa sottostante o in conseguenza di fattori predisponenti di varia origine (malattie allergiche, parassitarie, metaboliche, difetti di cheratinizzazione, alterazioni del microclima cutaneo). Mentre diverse specie batteriche possono essere implicate nel determinismo di piodermiti e otiti, tra i lieviti il microrganismo di più frequente riscontro è *Malassezia pachydermatis*, mentre *Candida albicans* è molto più rara². Vista la frequenza di infezioni miste, si rende necessario un approccio terapeutico combinato nei confronti di batteri e lieviti.

Il ruolo della terapia topica riveste un'importanza determinante al fine di una corretta gestione terapeutica sia in corso di infezioni cutanee che di otiti. Numerose molecole, ad esempio iodopovidone, etil lattato, triclosan, benzoilperossido e clorexidina, vengono usate comunemente per la detersione cutanea e/o auricolare, da sole o come coadiuvanti della terapia farmacologica sistemica. La clorexidina è un valido antisettico utilizzato sia in campo umano^{3,4,5,6} che veterinario^{7,8,9}, efficace verso diverse specie batteriche e *M. pachydermatis*⁸. In ambito veterinario viene usata a concentrazioni fino al 4% in prodotti destinati alla pulizia del pelo e disinfezione della cute del cane e del gatto e a concentrazioni minori come detergente auricolare e coadiuvante nella terapia delle otiti batteriche e da *Malassezia*¹.

Da qualche anno vengono studiati anche gli effetti antimicrobici di alcuni oli, fra cui l'essenza di *Melaleuca* (*Melaleuca alternifolia*), di cui è stata dimostrata l'efficacia verso diversi batteri e lieviti^{10,11,12,13}.

Scopo del lavoro è stato valutare e comparare l'attività antimicrobica *in vitro* di due prodotti commerciali ad uso veterinario, un prodotto ad uso cutaneo e un prodotto ad uso otologico, contenenti clorexidina a diversa concentrazione ed essenza di *Melaleuca* (Tabella 1). I prodotti utilizzati per le prove sono stati forniti dalla ditta di produzione (Istituto Farmaceutico Candioli S.p.a, Italia) e testati tal quali e diluiti.

MATERIALI E METODI

Parte A

I ceppi batterici usati nell'esperimento sono stati isolati da cani affetti da piodermite e otite. Nei confronti di entrambi i prodotti sono stati testati 3 ceppi batterici di 5 di-

verse specie (*Staphylococcus intermedius*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*) per un totale di 15 ceppi. Tutti gli isolati erano resistenti ad almeno 4 antibiotici (dati non riportati). Ogni esperimento è stato eseguito in doppio e in casi dubbi in triplicato per ciascun prodotto da testare. Sono stati considerati validi i risultati che hanno dato lo stesso esito in almeno due test.

La metodica impiegata è basata su un lavoro di Lloyd *et al.*⁷ con alcune modifiche. I prodotti sono stati provati tal quali e diluiti 1/5. In breve, ciascun ceppo, dopo una notte di incubazione a 37°C in agitazione in 40 ml di Brain Heart Infusion (BHI; Oxoid, Milano, Italia), veniva centrifugato a 5000 x g per 7 minuti (PK12IR, ALC). Il pellet veniva risospeso in Mueller Hinton Infusion (MHI; Oxoid, Milano, Italia) e quantificato mediante spettrofotometro a 550 nm (ultrospec2000, Pharmacia Biotech, Milano, Italia) per ottenere una torbidità finale corrispondente a 1,5 x 10⁸ Unità Formanti Colonia (UFC) per ml. Venti µl di ogni sospensione batterica venivano poi addizionati a 2 ml dei prodotti da provare (sia tal quali che diluiti 1/5 in acqua distillata sterile) e a 2 ml di una soluzione salina sterile (0,9% di NaCl, Sigma-Aldrich, Milano, Italia), come controllo della crescita batterica. In seguito, aliquote (100 µl) venivano rimosse a diversi intervalli di tempo (1, 3, 5, 10, 20, 30, 60, 120 minuti) e spatolate su Tryptone Soya Agar (TSA w/Lecithin and polysorbate 80; Himedia Laboratories, Mumbai, Maharashtra, India.), contenente lecitina e Tween 80 per neutralizzare l'attività residua della clorexidina⁽¹⁴⁾. Le piastre erano incubate a 36 °C per 48 ore e veniva quindi osservata l'eventuale crescita di colonie. Sono state considerate negative le piastre con il 100% di inibizione della crescita. I risultati ottenuti sono stati analizzati statisticamente con un test non parametrico (Wilcoxon signed rank test).

Parte B

Sono stati utilizzati per le prove 3 ceppi di *Malassezia pachydermatis* e 2 di *Candida albicans*. La metodica usata è basata sulle indicazioni della normativa europea UNI EN 1275, che specifica il metodo di prova e i requisiti minimi per l'attività fungicida di base di prodotti disinfettanti chimici e antisettici che formano un preparato fisicamente stabile¹⁵. La metodica consiste nel valutare la diminuzione del numero di microrganismi vitali dopo contatto con gli agenti antisettici per periodi di tempo variabili. Brevemente, i lieviti utilizzati corrispondono a 3 ceppi di *Malassezia pachydermatis* e a 2 ceppi di *Candida albicans* isolati a partire da cani con dermatite e/o otite. Dopo almeno due trapianti su terreno di Sabouraud destrosio (Biolife, Milano, Italia) le colonie ottenute sono state prelevate con spatola sterile e stemperate in soluzione fisiologica sterile. Queste sospensioni (Test Suspension - TS) sono state standardizzate a 1,5-5,0 x 10⁷ UFC/ml di soluzione tramite la valutazione della densità utilizzando uno spettrofotometro a 630 nm (ultrospec2000, Pharmacia Biotech, Milano, Italia). All'inizio di ogni prova 1 ml della TS è stato aggiunto in tre provette sterili contenenti rispettivamente 9 ml del prodotto da testare (concentrazione finale 90%), 7 ml di soluzione fisiologica e 2 ml del prodotto (concentrazione finale 20%), 9

Tabella 1
Concentrazione di clorexidina ed essenza di *Melaleuca*
nei due prodotti testati

Prodotto	% clorexidina	% olio di <i>Melaleuca</i>
Diclorex foam®	0,5%	3,0%
Diclorex oto®	0,3%	3,0%

ml di fisiologica (controllo di crescita). Dopo i tempi di contatto prefissati, 1 ml della sospensione è stato asportato da ciascuna provetta e immediatamente aggiunto a 9 ml di una soluzione neutralizzante contenente Tween 80 al 3% (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e lecitina 3 g/l (Sigma-Aldrich). Dopo 5 minuti 1 ml di questa sospensione è stato seminato su terreno di Sabouraud destrosio (Biolife, Milano, Italia). Dopo incubazione a 37 °C per 24-48 ore (*Candida*) e a 37 °C per 5 giorni (*Malassezia*) si è proceduto alla lettura delle UFC per singola piastra. Tenendo conto delle diluizioni utilizzate si è risaliti al numero di UFC, ovvero di microrganismi vitali presenti nelle sospensioni ai diversi tempi studiati. Secondo la norma seguita un determinato prodotto è considerato efficace nei confronti del fungo testato se si osserva una riduzione delle UFC di almeno 4 unità logaritmiche rispetto al numero iniziale. Sono stati valutati i risultati dopo 15 minuti essendo questo il tempo di contatto di riferimento della procedura seguita, che indica anche la possibilità di una valutazione a tempi aggiuntivi (5 e 30 minuti).

RISULTATI

Parte A

I risultati sono riassunti nella Tabella 2, che mostra il tempo di contatto necessario affinché ciascun prodotto sia in grado di inibire la crescita batterica. Il prodotto ad uso dermatologico è stato efficace su tutti i batteri entro 1 minuto; lo stesso prodotto, diluito 1/5, ha avuto bisogno di tempi maggiori sui *Proteus* e su un ceppo di *E. faecalis*.

Il prodotto otologico ha dimostrato attività antibatterica dopo 1-5 minuti di contatto verso *S. intermedius*, *E. coli* e

un ceppo di *P. aeruginosa*. Nei confronti degli altri germi il prodotto, sia tal quale che diluito, ha richiesto tempi più lunghi per inibire la crescita batterica.

L'analisi statistica ha evidenziato che il tempo di azione del prodotto otologico (tal quale e diluito) è significativamente maggiore del tempo di azione del prodotto dermatologico tal quale ($P < 0.001$). Non ci sono differenze significative fra il tempo d'azione del prodotto ad uso dermatologico usato tal quale e diluito.

Parte B

I risultati, riassunti nella Tabella 3, vengono espressi in scala logaritmica come differenza tra il numero di UFC della TS e il numero di UFC dopo contatto con i due prodotti (concentrazione 90%) per i diversi tempi. Non vengono riportati i dati relativi ai due prodotti al 20% in quanto non si è evidenziata efficacia verso i funghi testati. Le Figure 1 e 2 illustrano la diminuzione del numero di lieviti (*M. pachydermatis*) nel tempo di contatto. Ciascun grafico mostra la media dei risultati ottenuti sui tre ceppi in esame.

DISCUSSIONE

La terapia topica viene frequentemente utilizzata per le infezioni cutanee e dell'orecchio esterno nel cane. Questo approccio permette di utilizzare principi antimicrobici direttamente sui patogeni ad una concentrazione ottimale⁽¹⁾.

I nostri risultati sull'azione antibatterica *in vitro* mostrano che il prodotto ad uso cutaneo ha una elevata efficacia in quanto inibisce la crescita di tutti i ceppi entro un minuto. Dati quasi sovrapponibili si ottengono utilizzando il

Tabella 2
Tempo di contatto (espresso in minuti) necessario ai prodotti testati (non diluiti e diluiti 1/5) per ottenere culture batteriche negative (100% di inibizione della crescita)

Specie	Ceppo	Diclorex foam®	Diclorex oto®	Diclorex foam® 1/5	Diclorex oto® 1/5
<i>S. intermedius</i>	A	1	1	1	3
	B	1	1	1	120
	C	1	1	1	10
<i>E. faecalis</i>	A	1	5	1	60
	B	1	>120	10	120
	C	1	5	1	60
<i>E. coli</i>	A	1	3	1	10
	B	1	5	1	10
	C	1	5	1	20
<i>P. mirabilis</i>	A	1	60	60	>120
	B	1	20	60	>120
	C	1	60	30	>120
<i>P. aeruginosa</i>	A	1	3	1	1
	B	1	30	1	30
	C	1	20	1	30

Tabella 3

Entità della riduzione del numero di UFC (Unità Formanti Colonia) dei ceppi fungini dopo i diversi tempi di contatto con i prodotti al 90%. È evidenziata la colonna relativa ai 15 minuti di contatto perché è a questo tempo che deve essere valutata l'efficacia del prodotto¹⁵. Un numero superiore a 4 indica che il prodotto può essere considerato efficace.

Specie	Ceppo	Diclorex foam®			Diclorex oto®		
		5 min	15 min	30 min	5 min	15 min	30 min
<i>M. pachydermatis</i>	A	6,45	6,45	6,45	2,13	6,45	6,45
	B	6,35	6,35	6,35	3,00	6,35	6,35
	C	6,57	6,57	6,57	3,30	6,57	6,57
<i>C. albicans</i>	A	2,12	2,51	3,54	3,40	4,34	6,64
	B	2,33	3,94	4,21	3,53	4,20	6,50

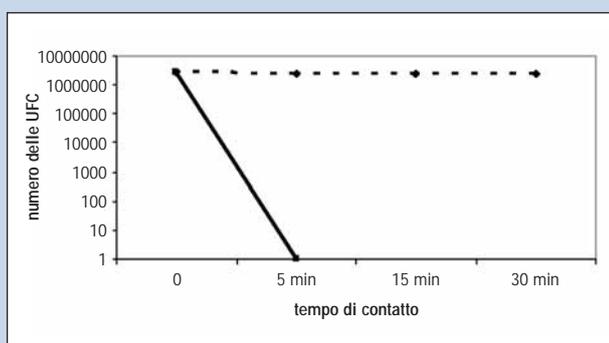


FIGURA 1 - Attività del prodotto ad uso dermatologico contro *Malassezia pachydermatis* (media su 3 ceppi). Il grafico è in scala logaritmica. La linea tratteggiata indica il numero di UFC (Unità Formanti Colonia) del controllo, la linea continua il numero di UFC dopo contatto col prodotto.

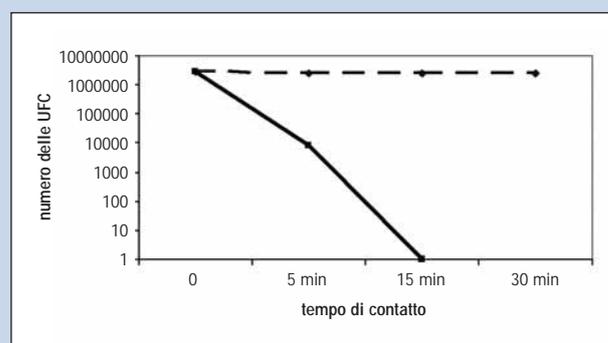


FIGURA 2 - Attività del prodotto otologico contro *Malassezia pachydermatis* (media su 3 ceppi). Il grafico è in scala logaritmica. La linea tratteggiata indica il numero di UFC (Unità Formanti Colonia) del controllo, la linea continua il numero di UFC dopo contatto col prodotto.

prodotto diluito 1/5, con l'eccezione di *P. mirabilis* che è in grado di crescere anche dopo un'ora di contatto. Il prodotto otologico ha dimostrato di agire rapidamente sui Gram positivi (eccetto un ceppo di *E. faecalis*) e su *E. coli*, mentre sono necessari tempi più lunghi per ottenere l'inibizione della crescita degli altri Gram negativi. Una volta diluito il prodotto perde notevolmente efficacia su tutti i batteri in esame. Lo studio *in vitro* conferma l'attività antimicrobica a largo spettro dei prodotti esaminati ed evidenzia come il tempo di contatto necessario per eliminare i microrganismi possa dipendere non solo dalla specie in causa, ma anche dalla consistenza del prodotto. I due preparati presentavano una diversa densità - più fluido il dermatologico, più vischioso il prodotto otologico - ed è possibile che questa caratteristica abbia influito negativamente sull'efficacia *in vitro* di quest'ultimo. Infatti nonostante la percentuale di clorexidina nel prodotto ad uso cutaneo sia solo leggermente superiore a quella del prodotto otologico, l'azione del primo risulta molto rapida su tutti i batteri testati ed è significativamente più efficace ($P > 0.001$). Alcuni lavori su prodotti per la disinfezione orale nell'uomo confermano questa ipotesi, ad esempio Vianna *et al.*⁵ hanno osservato che l'attività antibatterica della clorexidina a bassa concentrazione (0,2%) è superiore in irriganti liquidi rispetto ai gel, mentre a concentrazioni maggiori non vi sono differenze fra le due forme.

Per quanto riguarda l'attività fungicida, entrambi i prodotti si sono dimostrati efficaci nei confronti di *M. pachydermatis*, riducendo di più di 4 unità logaritmiche il numero di microrganismi dopo 15 minuti di contatto. Secondo la procedura adottata¹⁵ tutti e due possono quindi essere considerati efficaci nei confronti di questo agente eziologico. In particolare il prodotto ad uso dermatologico era già attivo, con una riduzione a 0 del numero di UFC, dopo 5 minuti di contatto. Per ciò che concerne le prove con i prodotti diluiti al 20%, si è dimostrata l'inefficacia degli stessi. Questo dato concorda con quanto riscontrato in letteratura su analoghe prove con concentrazioni simili di clorexidina⁸.

Per *C. albicans* i dati ottenuti portano a definire efficace il prodotto otologico e non efficace il prodotto ad uso dermatologico. Questo dato risulta di difficile interpretazione se si considera che la concentrazione di clorexidina è inferiore nel prodotto otologico e l'olio di *Melaleuca* è alla stessa concentrazione. L'ipotesi è che altri componenti del prodotto otologico possano agire in "sinergia" con la clorexidina. Ulteriori prove dovrebbero essere effettuate per chiarire questo punto, anche se l'interesse clinico-applicativo non sarebbe elevato. Le infezioni da *C. albicans* nel cane sono infatti evenienza rara, addirittura rarissima se confrontate con le infezioni da *Malassezia*².

In letteratura vi sono numerosi lavori che testimoniano

l'efficacia della clorexidina *in vitro* a differenti concentrazioni^{3,4,5,6}. In ambito veterinario questo principio attivo è contenuto in prodotti ad uso topico a diverse formulazioni. Lloyd e Lampport^{8,16} hanno testato su batteri e *Malassezia* preparazioni commerciali a diverse concentrazioni di clorexidina ottenendo risultati sovrapponibili ai nostri. Questo conferma come l'efficacia antimicrobica *in vitro* sia correlata non solo alla concentrazione di clorexidina, ma anche alla formulazione del prodotto.

Difficile quantificare il ruolo dell'essenza di *Melaleuca* presente alla stessa concentrazione (3,0%) in entrambi i prodotti. I dati bibliografici confermano un'attività antimicrobica di questo olio^{10,17,18} nonché una attività fungistatica e fungicida nei confronti di diversi lieviti^{12,13}, ma non evidenziano un effetto sinergico significativo se associato alla clorexidina¹¹. Data la presenza di questi due principi attivi in entrambi i prodotti testati, risulta comunque difficile attribuire un ruolo preciso all'olio di *Melaleuca* nell'attività antimicrobica.

In conclusione, le prove *in vitro* indicano che i due prodotti in studio possono essere vantaggiosamente utilizzati come coadiuvanti per il controllo delle infezioni cutanee e auricolari di origine batterica e da *Malassezia* nel cane; in particolare la contemporanea attività antibatterica ed antimicotica risulta di estrema utilità visto il frequente riscontro di infezioni miste. Riteniamo quindi che sarebbe utile proseguire lo studio per valutarne l'attività antimicrobica *in vivo*.

Questo studio è stato sponsorizzato dall'Istituto Farmaceutico Candioli, Beinasco (TO) Italia.

Parole chiave

Attività antimicrobica, clorexidina, batteri, lieviti, cute, orecchio.

Key words

Antimicrobial activity, chlorhexidine, bacteria, yeasts, skin, ear.

Bibliografia

1. Scott DW, Miller WH, Griffin CE: Small Animal Dermatology, 6th edn. Philadelphia, WB Saunders Co, 2000.
2. Greene CE: Infectious diseases of the dog and cat. 3rd edn. St. Louis. Saunders Elsevier, 2006.
3. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, et al.: In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 34 (6):424-428, 2001.
4. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pécora JD, et al.: Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. Braz Dent J. 14 (1):58-62, 2003.
5. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, et al.: In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 97 (1):79-84, 2004.
6. Edmiston CE, Seabrook GR, Johnson CP, Paulson DS, et al.: Comparative of a new and innovative 2% chlorhexidine gluconate-impregnated cloth with 4% chlorhexidine gluconate as topical antiseptic for preparation of the skin prior to surgery. Am J Infect Control. 35 (2):89-96, 2007.
7. Lloyd DH, Bond R, Lampport AI: Antimicrobial activity in vivo & in vitro of a canine ear cleanser. Vet Rec. 143 (4):11-12, 1998.
8. Lloyd DH, Lampport AI: Activity of Chlorhexidine shampoos in vitro against *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Malassezia pachydermatis*. Vet Rec. 144 (19):536-7, 1999.
9. Sánchez-Leal J, Mayóst I, Homedest J, Ferrer L: In vitro investigation of ceruminolytic activity of various otic cleansers for veterinary use. Vet Dermatol. 17 (2): 121-127, 2006.
10. Ferrini AM, Mannoni V, Salvatore G, Aureli P, et al.: Attività antibatterica dell'olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* e dei suoi principali componenti nei confronti di batteri di origine clinica ed alimentare. 4th Congresso Nazionale Società Italiana di Microbiologia, 2002, p 65.
11. Filoche SK, Soma K, Sissons CH: Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine diglucuronate. Oral Microbiol Immunol. 20 (4):221-225, 2005.
12. Hammer KA, Carson CF, Riley TV: In Vitro Activities of Ketoconazole, Econazole, Miconazole, and *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil against *Malassezia* Species. J Antimicrob Chemother. 44 (2):467-469, 2000.
13. Hammer KA, Carson CF, Riley TV: Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. J Appl Microbiol. 95 (4):853-860, 2003.
14. Johnston MD, Lambert RJ, Hanlon GW, Denyer SP: A rapid method for assessing the suitability of quenching agents for individual biocides as well as combinations. J Appl Microbiol. 92 (4):784-789, 2002.
15. Anon. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of basic fungicidal or basic yeasticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements (phase 1). EN 1275. Brussels: European Committee For Standardization, 2005.
16. Lloyd DH, Lampport AI: Antimicrobial activity in vitro of shampoos containing chlorhexidine and miconazole combined, and chlorhexidine alone. Vet Dermatol. 11 (Suppl. 1):41-61, 2000.
17. Carson CF, Riley TV: Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Letter in Appl Microbiol. 16:49-55, 1993.
18. Markham J: Antimicrobial effectiveness of tea tree oil. AusTTeam conference, 1996, pp 30-37.