

# Attività battericida *in vitro* di uno shampoo balsamo a base di olio di ribes nei confronti di: *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*



Negli ultimi anni, l'aumento delle segnalazioni di antibiotico-resistenza ha reso necessaria l'introduzione di nuove strategie terapeutiche. In particolare, l'impiego di antisettici topici nella piodermite superficiale canina ha mostrato spesso pari efficacia rispetto ai trattamenti antibiotici. Lo scopo dello studio è testare l'efficacia antibatterica *in vitro* di uno shampoo-balsamo a base di olio di semi di ribes nero, piroctone olamina, acido 18-beta-glicirretico e ceramidi. Sono stati selezionati 50 ceppi, ottenuti da cani con piodermite superficiale, rappresentati da: 10 *Staphylococcus pseudintermedius* meticillino-sensibili, 10 *Staphylococcus aureus* meticillino-sensibili, 10 *Staphylococcus pseudintermedius* meticillino-resistenti, 10 *Escherichia coli* e 10 *Pseudomonas aeruginosa*. Una concentrazione di  $10^6$  UFC/mL è stata utilizzata per diluizioni seriali in piastra sterile a 96 pozzetti contenente 100 µl dello shampoo da testare (Ribes Pet Shampoo Ultra®, NBF Milano), con concentrazioni scalari da 1:2 a 1:256. Dopo incubazione di 30 min a +37°C un'aliquota di 10 µl, è stata prelevata da ogni pozzetto, seminata su Tryptone Soya Agar con 5% di sangue di pecora, incubata per 24 ore per valutare la concentrazione minima battericida. Il prodotto ha completa attività battericida fino alla diluizione 1:16 compresa, per tutti i ceppi testati. A 1:32 sono state osservate le prime crescite batteriche per 4 ceppi di MRSP, 4 di *P. aeruginosa*, 2 *S. pseudintermedius* e 2 *E. coli*. A 1:64 per 6 ceppi di *S. pseudintermedius*, 6 *S. aureus*, 4 per MRSP, *P. aeruginosa* e *E. coli*. A 1:128 per 4 ceppi di *E. coli*, 2 per MRSP, *S. pseudintermedius*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A 1:256 per 2 soli ceppi di *S. aureus*.

Antonio Corona<sup>1</sup>  
Med Vet, PhD

Paola Persico<sup>3</sup>  
Med Vet, PhD

Antonella Vercelli<sup>1</sup>  
Med Vet,  
CES Derm&Ofta

Alessandro Gramenzi<sup>2</sup>  
Prof. Alimentazione  
animale

Luisa Cornegliani<sup>1</sup>  
Med Vet, PhD,  
Dipl ECVD

## INTRODUZIONE

In medicina veterinaria, le nuove linee guida per il trattamento delle piodermiti, superficiali o localizzate, consigliano, come primo intervento, l'impiego di

shampoo e/o spray formulati con antisettici<sup>1-2</sup>. L'intensificarsi dei fenomeni di resistenza, soprattutto a carico degli stafilococchi meticillino-resistenti come *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) e *Staphylococcus aureus* (MRSA), ha favorito un approccio terapeutico differente. Pertanto, si rileva un maggiore impiego di prodotti contenenti antisettici, quali la clorexidina a

<sup>1</sup> Clinica Veterinaria Città di Torino, Corso Traiano 99/D, 10135 Torino

<sup>2</sup> Facoltà di Medicina Veterinaria, Teramo

<sup>3</sup> Libero professionista, Milano

\*Corresponding Author (a.corona@clinivetorino.eu)

Ricevuto: 26/03/2019 - Accettato: 06/06/2019

differenti concentrazioni, in sostituzione agli antibiotici spesso rivelatisi inefficaci nelle prove *in vitro*<sup>3</sup>. Conseguentemente, in caso d'infezioni superficiali, le terapie topiche hanno assunto un'importanza crescente in medicina umana e veterinaria. Attualmente poco si conosce riguardo la specifica attività antimicrobica dei prodotti naturali, ovviamente differenti dai prodotti antisettici simili o appartenenti alla stessa categoria della clorexidina.

**Nello studio viene valutata l'attività battericida *in vitro* di uno shampoo balsamo a base di olio di semi di ribes nero, nei confronti di batteri responsabili di pododermite.**

Differenti approcci terapeutici, per contrastare lo sviluppo dell'antibiotico resistenza, hanno rivalutato, soprattutto in medicina umana, il ruolo terapeutico dei rimedi naturali, tra cui alcune essenze di miele<sup>4-5</sup>, soluzioni con nano particelle argentiche in associazione a piante medicinali<sup>6</sup>, estratti alcoolici di origano<sup>7-8</sup>. Questi principi attivi naturali sono stati studiati, singolarmente o in associazione, ma pochi studi hanno valutato la capacità antimicrobica *in vitro* degli shampoo a uso veterinario<sup>6-9</sup> nei confronti dei principali batteri isolati dalla cute di cani con pododermite superficiale<sup>1,2</sup>. Il lavoro ha lo scopo di descrivere l'attività antibatterica *in vitro* di uno shampoo-balsamo dermatologico, attualmente in commercio, a base di olio di semi di ribes nero, acido 18-beta glicirretico, piroctone olamina e ceramidi, nei confronti di differenti ceppi batterici isolati dalla cute di cani con pododermite ricorrente.

## MATERIALI E METODI

### Caratterizzazione batterica

Sono stati selezionati 50 ceppi, ottenuti da tamponi cutanei di cani con pododermite ricorrente superficiale, rappresentati da: 10 *Staphylococcus pseudintermedius* (SP), 10 *Staphylococcus aureus* (SA), 10 *Staphylococcus pseudintermedius* meticillino-resistente (MRSP), 10 *Escherichia coli* (EC) e 10 *Pseudomonas aeruginosa* (PA). I campioni, seminati su piastre di Tryptone Soya Agar con 5% sangue di pecora, Mannitol Salt Agar e McConkey Agar (Oxoid®, Italia), incubate a 37°C per 24-48 h, prima della lettura finale.

Basandosi su standard d'identificazione fenotipica, gli isolati in purezza, sono stati sottoposti a colorazione Gram, test della catalasi e ossidasi. L'identificazione biochimico-enzimatica è stata eseguita mediante gallerie API® con database apiweb (bioMérieux®, Francia) e con valore accettabile  $\geq 85\%$  per affinità alla specie. Gli stafilococchi identificati dal sistema come *Staphylococcus intermedius* sono stati qui indicati come

*Staphylococcus pseudintermedius* (SP) in base alle recenti classificazioni del relativo gruppo<sup>10</sup>. Per l'evidenziazione dei ceppi meticillino-resistenti sono stati eseguiti: il test di diffusione dell'oxacillina (ODD - 5 µg/mL), secondo metodo Kirby-Bauer, in accordo con le indicazioni del *Clinical Laboratory and Standard Institute*<sup>11</sup> e la semina su terreno selettivo Brilliance MRSA2 Agar<sup>12</sup> (Oxoid®, Italia).

I 40 ceppi batterici, ad eccezione degli MRSP, presentavano caratteristiche variabili di sensibilità *in vitro* agli antibiotici, con resistenze non superiori a due differenti classi di antibiotici e pertanto definiti meticillino-sensibili per la popolazione stafilococcica e non-MDR (Multi-Drug Resistant<sup>13</sup>) per i restanti.

### Test di sensibilità *in vitro*

Il test di sensibilità *in vitro* dello shampoo-balsamo a base di olio di ribes (Ribes Pet Shampoo Ultra® NBF Lines, Milano) è stato eseguito, in doppio, con metodo di microdiluizione in piastra<sup>14-15</sup>. I ceppi batterici, isolati in purezza, e sospesi in tampone fosfato salino (PBS; pH 7,2) fino a una torbidità pari a 0,5 McFarland, tramite densimetro (DEN-1B, Biosan® Sia, Latvia) e corrispondente a una concentrazione di circa 10<sup>8</sup> UFC/mL di batteri. La sospensione batterica poi ulteriormente diluita 1:100, per ottenere una concentrazione finale di 10<sup>6</sup> UFC/mL, è stata utilizzata per le diluizioni seriali in una piastra sterile a 96 pozzetti

**La valutazione dell'attività battericida *in vitro* è stata eseguita su ceppi di *S. pseudintermedius* meticillino-sensibili e resistenti, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, isolati dalla cute di cani in corso di pododermite superficiale.**

contenente 100 µL dello shampoo da testare (Ribes Pet Shampoo Ultra®, NBF Lines, Milano), con concentrazioni scalari da 1:2 a 1:256<sup>4-5</sup>; come controllo positivo la sospensione batterica addizionata a 100 µL di PBS senza antisettico. Dopo incubazione di 30 min a +37°C un'aliquota di 10 µL, è stata prelevata da ogni pozzetto e seminata su Tryptone Soya Agar con 5% di sangue di pecora e incubata per ulteriori 24h. È stata quindi effettuata visivamente la conta delle unità formanti colonie batteriche (UFC) su piastra fino a un massimo di 100 e poi definite "confluenti" quando troppo numerose per essere contate singolarmente. Si valutava quindi la concentrazione minima battericida<sup>16</sup> (MBC) definita come la più bassa concentrazione in grado di inibire la crescita batterica di almeno il 99,9% della popolazione iniziale<sup>17</sup> (assenza di crescita su piastra).

**Tabella 1 - Numero dei ceppi, per ciascuna specie, sviluppati alle progressive diluizioni scalari e relativi gruppi di UFC riscontrate**

DIL.	MRSP	SP	SA	PA	EC	UFC/ml
1:2	0	0	0	0	0	0
1:4	0	0	0	0	0	0
1:8	0	0	0	0	0	0
1:16	0	0	0	0	0	0
1:32	4	2	0	4	2	0-10
1:64	4	6	6	4	4	11-20
1:128	2	2	2	2	4	21-50
1:256	-	-	2	-	-	> 100
Totale	10	10	10	10	10	

## RISULTATI

Per tutti i 50 ceppi testati, il prodotto ha mostrato completa attività battericida fino alla quarta diluizione compresa, pari a 1:16. Alla diluizione 1:32 sono state osservate le prime crescite batteriche, in particolare per 4 ceppi di MRSP, 4 di *P. aeruginosa*, 2 *S. pseudintermedius* e 2 *E. coli*. Alla diluizione 1:64 per 6 ceppi di *S. pseudintermedius*, 6 *S. aureus*, 4 per MRSP, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Alla successiva di 1:128 per 4 ceppi di *E. coli*, 2 per MRSP, *S. pseudintermedius*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. All'ultima diluizione di 1:256 per 2 soli ceppi di *S. aureus* (tabella 1).

Le UFC rilevate sono state omogenee tra le differenti specie batteriche e in relazione alle diluizioni eseguite è stato possibile individuare range progressivi di crescita fino alla diluizione 1:256 con aspetto confluyente (tabella 1).

## DISCUSSIONE

Lo shampoo-balsamo a base di olio di ribes testato ha dimostrato di possedere attività battericida *in vitro* nei confronti dei più comuni patogeni cutanei, responsabili delle piodermiti superficiali canine. Precedenti ricerche, eseguite con la medesima metodologia, hanno evidenziato le caratteristiche antimicrobiche *in vitro* di altri prodotti a uso cutaneo o/e otologico<sup>14-15</sup>, mostrando la capacità battericida di noti antisettici locali, quale a esempio, la clorexidina digluconato in differenti concentrazioni, il Tris-EDTA, l'alcool isopropilico, il perossido di benzoile, spesso associati a bassi valori di pH della soluzione disinfettante o ad altre componenti con attività antimicrobica. Lo shampoo-balsamo, sottoposto allo studio, è da qualche tempo sul mercato; evidenzia in etichetta le indicazioni per l'impiego nella shampoo-terapia per cani con dermatite, per le attività antibatterica-antinfiammatoria, pro-

tettiva-lentiva della cute. Pertanto, si è voluto verificare *in vitro* la reale efficacia battericida nei confronti dei più comuni batteri responsabili di piodermite superficiale canina.

L'interesse per i prodotti topici ad attività antimicrobica ha assunto sempre maggiore importanza come terapia singola o adiuvante per il trattamento delle infezioni batteriche o micotiche superficiali del cane<sup>18-19</sup>. L'emergenza susseguente alla crescente antibiotico-resistenza ha stimolato lo sviluppo di nuove strategie e di nuovi prodotti con attività microbica. In medicina umana si è analizzato il ruolo terapeutico di prodotti

**L'inibizione della crescita batterica è stata osservata, per tutte le specie testate, fino alla diluizione 1:16 compresa, anche per i ceppi con caratteristiche di meticillino-resistenza.**

naturali fitoterapici o similari<sup>4-5-6-7-8</sup>, osservando che le loro capacità antimicrobiche sono imputabili a meccanismi tra loro diversificati.

Nel caso degli estratti pastorizzati di diverse essenze di miele pare che l'attività antimicrobica sia imputabile alla produzione d'idrogeno perossido, al suo basso pH e all'alto contenuto di zuccheri che li rendono altamente osmolarizzanti<sup>4</sup>. Similmente, estratti pastorizzati di miele millefiori, sono stati testati nei confronti di ceppi di MRSA e MSSA, con risultati positivi e incoraggianti<sup>5</sup>.

L'efficacia *in vitro* di uno shampoo contenente nanoparticelle argentiche sintetizzate da *Aradica indica* (olio di neem) in combinazione con estratti di oli vegetali di piante medicinali quali *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martini*, *Eucalyptus globulus*, hanno dimostrato una potente attività antimicrobica nei confronti di *Staphylo-*

**Il problema dell'antibiotico-resistenza ha stimolato la ricerca nel settore della terapia topica. Tra i componenti dello shampoo troviamo l'olio di semi di ribes nero e la piroctolamina già noti per le loro azioni antisettiche.**

*coccus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*<sup>6</sup>. Le proprietà antibatteriche e antiossidanti di estratti alcolici di *Origanum vulgare* sono state attribuite alla presenza d'isomeri fenolici di carvacrolo e timolo, che sono i maggiori componenti di questo olio essenziale. L'elevata attività citotossica, antiossidante e la MIC di questa sostanza è stata dimostrata tramite studi *in vitro* nei confronti di *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*<sup>7</sup> e *Streptococcus pyogenes*<sup>8</sup>.

Per quanto riguarda il prodotto oggetto dello studio, è possibile asserire che l'olio di semi di ribes nero, già noto in dermatologia umana per le sue proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, rivela con altri studi, l'attività antimicrobica *in vitro*<sup>20-21</sup>. La piroctolamina, svolge un'importante azione antisettica grazie alla sua intrinseca attività antibatterica ad ampio spettro verso germi Gram positivi, Gram negativi e miceti; l'acido 18  $\beta$ -glicirretico, le proteine vegetali, il tocoferolo e un complesso di ceramidi, hanno invece azioni emollienti e protettive nei confronti della barriera cutanea. L'insieme di tali componenti dimostra un'azione antibatterica *in vitro*, capace di determinare la morte batterica entro 30 minuti dal suo contatto a diluizioni quattro volte superiori al prodotto di partenza. Al momento non vi sono dati che possano evidenziare se un

singolo elemento abbia la specifica attività battericida, rispetto a un altro, o sia solo l'insieme di tutte le componenti a determinarne questo effetto *in vitro*.

Nonostante la ricerca apporti nuovi dati per ampliare le conoscenze sulla capacità antimicrobica di shampoo in ambito veterinario<sup>6</sup>, lo studio presenta ancora alcune criticità, ovvero le limitazioni correlate all'analisi *in vitro*, il numero contenuto di ceppi testati e l'impossibilità di separare le singole componenti dello shampoo per valutarne le specifiche attività. Ciò nonostante lo shampoo a base di olio di semi di ribes nero può essere considerato un antisettico ad azione locale al pari di altri shampoo caratterizzati dalla presenza di clorexidina, a differenti percentuali e/o di Tris-EDTA, la cui azione battericida è già nota *in vitro*<sup>15-20</sup> e *in vivo*<sup>22-23</sup>.

Anche i peptidi naturali e derivati di sintesi, come la lattoferricina, sono stati testati in passato per evidenziare l'attività battericida *in vitro* e come possibile alternativa nella terapia topica<sup>24-25</sup>.

L'assenza di crescita batterica fino alla diluizione 1:32 e la presenza di soli due ceppi di SA con crescita >100 UFC/ml dimostrano comunque un rilevante abbattimento della carica microbica che ben depongono a favore dell'efficacia dello shampoo oggetto dello studio. In futuro sarà interessante poter eseguire uno studio comparativo nei confronti di antisettici quali la clorexidina, per confermarne l'attività antimicrobica anche *in vivo*.

## RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano il dott. Carlo Maria Colombo e il dott. Giuseppe Pappini di NBF Lanes (Milano), per avere parzialmente supportato lo studio *in vitro*.

## PUNTI CHIAVE

- L'impiego della shampoo terapia nel trattamento delle piodermi superficiali è suggerito nelle linee guida al fine di limitare l'utilizzo degli antibiotici.
- Lo shampoo balsamo testato nei confronti di 50 ceppi batterici ha mostrato attività battericida *in vitro* fino alla diluizione 1:16 compresa.
- Gli stafilococchi meticillino-resistenti testati (MRSP) sono risultati sensibili all'azione dello shampoo oggetto della ricerca.
- Insieme ai prodotti per uso otologico anche lo shampoo dermatologico può essere utilizzato come prodotto ad azione antisettica locale.
- I diversi componenti dello shampoo esplicano una sinergica azione battericida.
- Si proseguirà lo studio del prodotto al fine di confermare l'attività battericida *in vivo*.



## In vitro antibacterial efficacy of a based blackcurrant oil shampoo against: *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*

### Summary

In the last years the increase of antibiotic resistance has introduced the must of new therapeutic strategies. The use of topical anti-septic for dogs' superficial pyoderma has proven equivalent efficacy compared to systemic antibiotic. The aim of this study was to test the in vitro antibacterial efficacy of a shampoo/conditioner containing blackcurrant seed oil, piroctone olamine, 18-beta-glycyrrhethinic acid and ceramides. Fifty bacterial strains, obtained by dogs with superficial pyoderma, were selected. They were represented by: 10 *Staphylococcus pseudintermedius*, 10 *Staphylococcus aureus*, 10 *Staphylococcus pseudintermedius* methicillin-resistant, 10 *Escherichia coli*, 10 *Pseudomonas aeruginosa*.

A concentration of  $10^6$  UCF/mL of selected bacteria was used for serial dilution in a sterile plate with 96 wells; these were filled with 100  $\mu$ L of the tested shampoo (Ribes Pet Shampoo® Ultra, NBF Lines, Milan) with progressive dilution from 1:2 to 1:256. After the incubation at 37°C for 30 minutes, a rate of 10  $\mu$ L was taken from any single well. Each one was sown on Tryptone Soya agar with 5% of sheep blood and incubated for 24 hours to evaluate the MIC. The product showed bactericidal activity till a dilution of 1:16 for all strains. At 1:32 dilution, grown 4 MRSP, 4 *P. aeruginosa*, 2 *SIG* e 2 *E. coli*; at 1:64 dilution, 6 *SIG*, 6 *S. aureus*, 4 MRSP, *P. aeruginosa* and *E. coli*; at 1:128 dilution were present 4 *E. coli*, 2 MRSP, *S. pseudintermedius*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Finally at 1:256 dilution, 2 strains of *S. aureus* grown.

### BIBLIOGRAFIA

1. Beco L, Guaguère E, Lorente Méndez C et al. Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections: part 1 and 2 - antimicrobial choice, treatment regimens and compliance. *Veterinary Record* 2013, 19: 72-78.
2. Hillier A, Lloyd DH, Weese JS et al. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis. *Veterinary Dermatology* 2014, 25: 163-175.
3. Loeffler A, Linek M, Moodley A et al. First report of multiresistant, mecA-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology* 2007, 18: 412-21.
4. Mandal MD, Mandal S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* Apr; 2011, vol. 1(2):154-60.
5. Rani GN, Budumuru R, Bandaru NR. Antimicrobial Activity of Honey with Special Reference to Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). *Journal of Clinical and Diagnostic research; JCDR* Aug 11(8), 2017.
6. Bansod SD, Bawaskar MS, Gade AK et al. Development of shampoo, soap and ointment formulated by green synthesised silver nanoparticles functionalised with antimicrobial plants oils in veterinary dermatology: treatment and prevention strategies. *IET, Nanobiotechnology* Aug;9(4):165-71, 2015.
7. Coccimiglio J, Alipour M, Jiang ZH et al. Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Activities of the Ethanolic *Origanum vulgare* Extract and Its Major Constituents. *Oxidative medicine and cellular longevity* Epub Mar 9:1404505, 2016.
8. Wijesundara NM, Rupasinghe HPV. Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. *Microbial Pathogenesis* Apr; 117:118-127, 2018.
9. Young R, Buckley L, McEwan N, Nuttall T. Comparative in vitro efficacy of antimicrobial shampoos: a pilot study. *Veterinary Dermatology*; Feb;23(1):36-40, 2012.
10. Devriese LA, Hermans K, Baele M et al. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Microbiology*; Jan 1;133(1-2):206-7, 2009.
11. Clinical Laboratory and Standard Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standards - fourth edition. CLSI document VET01-A4. Wayne, PA: CLSI; 2013
12. Horstmann C, Mueller RS, Straubinger RK, Werckenthin C. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* with commercially available selective media. *Lett Appl Microbiol*. Jan; 54(1):26-31, 2012.
13. Magiorakos AP1, Srinivasan A, Carey RB et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance *Clin Microbiol Infect*. Mar;18(3):268-81, 2012.
14. Guardabassi L, Ghibaud G, Damborg P. In vitro antimicrobial activity of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris-EDTA. *Veterinary Dermatology*, Jun;21(3):282-6, 2009.
15. Swinney A, Fazakerley J, McEwan N et al. Comparative in vitro antimicrobial efficacy of commercial ear cleaners. *Veterinary Dermatology* 19: 373-9, 2008.
16. CLSI, Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline, CLSI document M26-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Roadn Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 1998.
17. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. Apr;6(2):71-79, 2016.
18. Bajwa J. Canine superficial pyoderma and therapeutic considerations. *The Canadian Veterinary Journal* 57 (2): 204-206, 2016.
19. Loeffler A, Lloyd DH. What has changed in canine pyoderma? A narrative review. *The Veterinary Journal* 235: 73-82, 2018.
20. Widén C, Renvert S, Persson GR. Antibacterial activity of berry juices, an in vitro study. *Acta Odontol Scand* 73(7):539-43, 2015.
21. Miladinović B, Kostić M, Savikin K et al. Chemical profile and antioxidative and antimicrobial activity of juices and extracts of 4 black currants varieties (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Food Science* Mar;79(3), 2014.
22. Borio S, Colombo S, La Rosa G et al. Effectiveness of a combined (4% chlorhexidine digluconate shampoo and solution) protocol in MRS and non-MRS canine superficial pyoderma: a randomized, blinded, antibiotic-controlled study. *Veterinary Dermatology* 26: 339-e72, 2015.
23. Viaud S, Maynard L and Sanquer A. Comparison of two shampoos as sole treatment for canine bacterial overgrowth syndrome. *Veterinary Record* Jun 30;170(26), 2012.
24. Corona A, Vercelli A, Bruni N et al. In vitro bactericidal activity of Lactoferrin and other enzymes on bacteria selected from dogs with pyoderma. *Special Issue: Abstracts from the 8th World Congress of Veterinary Dermatology*, Vol 27 May 31 June 4: 1-126, 2016.
25. Bruni N, Capucchio MT, Biasibetti E et al. Review - Antimicrobial Activity of Lactoferrin-Related Peptides and Applications in Human and Veterinary Medicine. *Molecules*, Jun11,21(6), 2016.