

مقایسه‌ی اثرات درمانی اسانس گیاه مرزنجوش با کرم کتوکونازول ۲٪ در درمان درماتوفیتوزیس تجربی ناشی از میکروسپوروم کنیس در گربه‌ها

حمید خرم^۱، سیامک مشهدی رفیعی^{۲*}، منصور بیات^۳

چکیده

قرن‌ها استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان بیماری‌های مختلف در بسیاری از جوامع بشری شناخته شده و کاربرد داشته است که همچنین خواص اسانس آن‌ها نیز به خوبی آشکار شده است. اسانس گیاه مرزنجوش دارای اثرات آنتی اکسیدانی، ضد باکتری، ضد قارچی، ضد نفخ، ضد اسپاسم و ضد درد مؤثری می‌باشد. در این مطالعه، از داروی ضد قارچی کرم کتوکونازول ۲٪ و اسانس گیاه مرزنجوش به منظور درمان بیماری درماتوفیتوز تجربی ناشی از قارچ میکروسپوروم کنیس در گربه‌ها استفاده شد. تعداد ۳۶ قلابه گربه نر با نژاد بومی مو کوتاه در سه گروه مورد مطالعه و ارزیابی بالینی قرار گرفتند. در ادامه حداقل غلظت مهارکنندگی برای اسانس گیاه مرزنجوش ۱۹/۱ μ/ml تعیین شد. شروع درمان از ۵ روز پس از آلوده‌سازی در نظر گرفته شد که به صورت هر ۱۲ ساعت و به مدت ۴۰ روز ادامه یافت. بیماران هر دو گروه در روز ۴۰ به طور کامل درمان شدند. نتایج نشان می‌دهد که اسانس گیاه مرزنجوش همسان با کرم کتوکونازول ۲٪ یک داروی مؤثر برای درمان بیماری درماتوفیتوز ناشی از قارچ میکروسپوروم کنیس است.

واژگان کلیدی: اسانس، مرزنجوش، درماتوفیتوز، گربه، کتوکونازول.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲

مقدمه

بیماری درماتوفیتوز یک بیماری پوستی با خطر زئونوز می‌باشد. درماتوفیت‌ها بر اساس محل سکونت طبیعی از نظر مخزن و منبع شامل سه نوع ژئوفیلیک، زوفیلیک و آنتروپوفیلیک می‌باشند. بیماری درماتوفیتوز در سراسر جهان انتشار دارد و عوامل ایجاد کننده‌ی آن شامل قارچ‌های میکروسپوروم، تریکوفیتون و اپیدرموفیتون است. قارچ میکروسپوروم کنیس (*M.canis*) شایع‌ترین علت بیماری درماتوفیتوز در حیوانات و انسان است.

۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. (srivet@yahoo.com)

۳- گروه باتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

موضوعی اصولاً هر مورد تأیید قطعی بیماری درماتوفیتوز باید درمان را دریافت کند و از آنجایی که این بیماری به بهداشت عمومی آسیب می‌زند، درمان فوری برای بیماران لازم است. از سوی دیگر داروهای ضد قارچی موضعی که می‌توانند بیماری درماتوفیتوز را درمان کنند، فواید و برتری ویژه‌ای نسبت به یکدیگر ندارند و علاوه بر این عوارض جانبی و بروز مقاومت‌های قارچی نیز محتمل است. کتوکونازول یکی از داروهای ضد قارچی است که در مصرف سیستمیک میزان موفقیت متوسطی در درمان میکروسپوروم کنیس داشته است و لذا با توجه به وجود برخی محدودیت‌ها در مصرف خوراکی دارو در طب دامپزشکی، دامپزشکان بیشتر از کرم کتوکونازول برای درمان ضایعات کوچک قارچی استفاده می‌کنند. از سوی دیگر امروزه نقش گیاهان دارویی و خواص آن‌ها در درمان بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است که تعداد زیادی از آن‌ها متعلق به خانواده‌ی نعنائیان (*Lamiaceae*) هستند. در این خانواده، اسانس گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare*) غنی از ترکیبات مونوترپن (*Monoterpenes*)، سزکویی‌ترین (*Sesquiterpenes*) و فنولی (*Phenolic*) است که اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی مطلوب و گسترده‌ای دارد و همچنین هزاران سال است که این گیاه در درمان امراض مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. گیاه مرزنجوش در تقویت عملکرد دستگاه‌های گوارش و تنفس نقش دارد. این گیاه در مناطق شمالی ایران رشد می‌کند و اجزای اصلی ضد قارچی گیاه مرزنجوش را فنول‌هایی مانند تیمول (*Thymol*) و کارواکرول (*Carvacrol*) تشکیل می‌دهد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر اسانس گیاه مرزنجوش برای درمان بیماری درماتوفیتوز تجربی

ناشی از قارچ میکروسپوروم کنیس در گربه‌ها و مقایسه‌ی آن با کرم کتوکونازول است (۲۰، ۱۷، ۱۴، ۹، ۳ و ۱).

مواد و روش کار

در این مطالعه از ۳۶ قلابه گربه نر با نژاد مو کوتاه بومی (DSH) با وزن مشابه (از ۱/۵ تا ۲ کیلوگرم) و سنین مشابه (۶ تا ۱۲ ماهگی) استفاده شد. تمام گربه‌ها در قفس‌های استاندارد فولادی ضد زنگ به صورت جداگانه و در شرایط کنترل شده (۱۲ ساعت نور، رطوبت نسبی $3 \pm 50\%$ درجه حرارت 1 ± 24 درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. همچنین این گربه‌ها در شرایط بهینه‌ی نگهداری و به مدت یک هفته با رژیم غذایی پایه تغذیه شدند (۸ و ۷). اسانس گیاه مرزنجوش مورد استفاده در این تحقیق به کمک روش تقطیر با آب (Hydrodistillation) و با استفاده از مایکروویو و کلونجر (Clevenger apparatus) تهیه شد و در ادامه از کرم کتوکونازول ۲٪ محصول شرکت داروپخش ایران استفاده شد (۲). قارچ میکروسپوروم کنیس مورد استفاده در این مطالعه از سویه استاندارد (PTCC-5069) بوده و همچنین جهت تعیین مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس مرزنجوش و کرم کتوکونازول ۲٪ از سوسپانسیون سلولی معادل $5 \times 10^4 - 0.5$ سلول بر میلی‌لیتر مطابق استاندارد (CLSI) و روش شماره (M38-A) استفاده گردید (۱۵، ۸ و ۷). آزمایش مورد نظر در محیط کشت RPMI 1640 حاوی L-Glutamine فاقد بی‌کربنات سدیم که در pH 7 با غلظت 0.165 مولار morpholine propane sulfonic acid بافری شده است، انجام شد. از سوش استاندارد که در محیط کشت potato dextrose agar به مدت ۱۰ روز در 28°C آماده شده بود، سوسپانسیونی با خراش دادن سطح کلنی در سرم فیزیولوژیک استریل تهیه گردید. سپس با استفاده از لام نئوبار در زیر میکروسکوپ شمارش و غلظت آن طوری

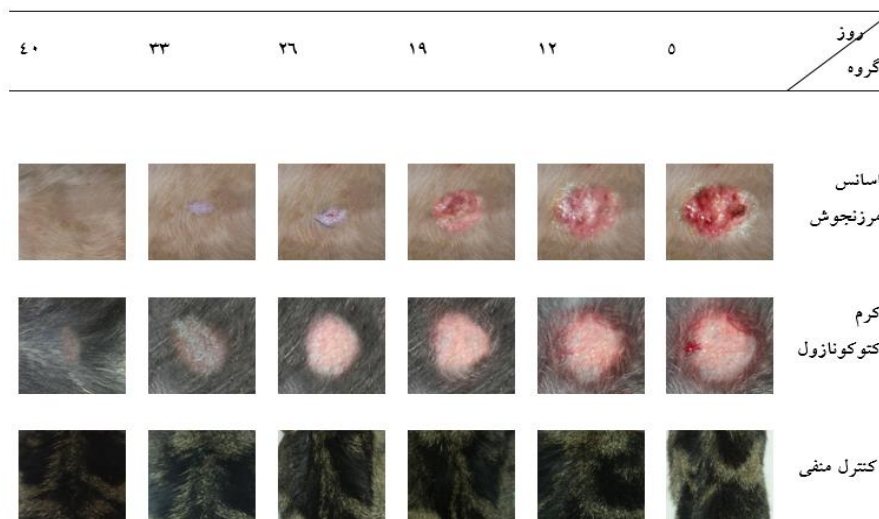
تنظیم گردید که پس از افزودن مقدار ثابتی از سوسپانسیون به چاهک های حاوی محیط کشت و داروها، تعداد سلول‌های قارچی میکروسپوروم کنیس برابر با $10^4 \times 5 - 0.5$ سلول بر میلی‌لیتر (cfu/ml) بدست آمد. سپس با افزودن سوسپانسیون به محیط کشت و داروها، محلول نهایی به مدت ۱ هفته در دمای 28°C انکوبه گردید و از نظر رشد عناصر قارچی، هم به صورت بررسی چشمی و هم subculture در محیط کشت Potato dextrose agar بررسی انجام شد (۱۵). مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی برای اسانس گیاه مرزنجوش و کرم کتوکونازول ۲٪ به ترتیب $0.19 \mu\text{l/ml}$ و $0.89 \mu\text{l/ml}$ محاسبه شد. به منظور آلوده سازی گربه‌ها، ناحیه‌ی قدامی-پشتی (بین شانه‌ها) در هر گربه به اندازه‌ی ۴ سانتی‌متر مربع به آرامی و به دقت با تیغ جراحی استریل (Scalpel) خراشیده شد که این‌گونه خراشیده شدن ملایم پوست موجب حساسیت بیشتر پوست حیوان نسبت به عفونت می‌گردد. سوسپانسیون قارچی مورد استفاده شامل کلنی‌های قارچ میکروسپوروم کنیس می‌باشد که با محلول استریل نمکی استاندارد پوشیده شده است. سپس سوسپانسیون حاوی 10^6 اسپور در میلی‌لیتر قارچ میکروسپوروم کنیس با نوک پستور و به آرامی در محل مورد نظر تلقیح و کل محل مورد نظر به کمک وازلین پوشانیده شد تا شرایط ناحیه‌ی مذکور را به مدت ۲۴ ساعت حفظ کند. در این تحقیق، گربه‌ها به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند که شامل گروه کنترل منفی، گروه درمان با اسانس گیاه مرزنجوش و گروه درمان با کرم کتوکونازول ۲٪ می‌باشد. در ادامه، تأیید بروز عفونت در روز پنجم پس از آلوده‌سازی به کمک آزمایش قارچی (آزمایش مستقیم مو و ارزیابی کشت) در همه‌ی گربه‌ها به غیر از گروه کنترل منفی مشخص گردید (۱۸، ۱۶، ۱۳، ۱۲ و ۴). براساس تحقیقات گذشته، درمان در گروه‌های اسانس مرزنجوش و کرم کتوکونازول ۲٪ به صورت هر ۱۲ ساعت یکبار در روز

دقیق انجام گرفته است که تصاویر در طول دوره‌ی درمان تغییرات را به خوبی نشان می‌دهند (نگاره‌ی یک). در این تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی برای اسانس مرزنجوش $0.19 \mu\text{l/ml}$ تعیین شد. در روز پنجم بعد از ایجاد آلودگی ظاهر ضایعات در همه‌ی گربه‌ها به جز گروه کنترل منفی حاکی از وجود عفونت قارچی است. میانگین رتبه‌ی ضایعات پوستی در روز پنجم (شروع درمان) برای همه‌ی گربه‌ها به جز گروه کنترل منفی، بین $4/4$ تا $4/8$ بود. میانگین رتبه‌ی ضایعات پوستی در روز پنجم نشان داد که در گروه درمان با اسانس مرزنجوش ($4/75$)، نزدیک به میانگین رتبه‌ی ضایعات پوستی در گروه درمان با کرم کتوکونازول ۲٪ ($4/43$) است. روند منطقی کاهش میانگین رتبه‌ی ضایعات پوستی در گروه‌های درمان با کرم کتوکونازول ۲٪ و اسانس مرزنجوش تا روز چهارم به تدریج ادامه یافت به طوری که رتبه‌ی ضایعات پوستی گروه‌های درمانی در روز چهارم نزدیک به صفر شد (نمودار ۱). در ادامه آزمون‌های آماری نشان دادند که تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) در روزهای ۱۹، ۲۶ و ۴۰ بین دو گروه اسانس مرزنجوش با کرم کتوکونازول ۲٪ وجود دارد. در تأیید آن ارزیابی‌های آماری داخل گروهی در گروه‌های درمان با اسانس مرزنجوش و کرم کتوکونازول ۲٪ نشان می‌دهد که کاهش منطقی رتبه‌ی ضایعات پوستی در طی دوره‌ی درمان نیز اتفاق افتاده است (نمودارهای ۲ و ۳). نتایج کشت قارچ در سه کشت متوالی برای تمامی گروه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. در گروه درمان با اسانس مرزنجوش در روز ۳۳ پس از آلوده سازی، ۵۰٪ نمونه‌ها مثبت و برای گروه درمان با کرم کتوکونازول ۲٪ در همین روز، ۳۳٪ نمونه‌ها مثبت ارزیابی شد. همچنین نتیجه‌ی کشت قارچ برای گروه کنترل منفی در هر سه نوبت و برای گروه‌های درمان با اسانس مرزنجوش و کرم کتوکونازول ۲٪ در روزهای ۴۰ و ۵۰، منفی گزارش شد.

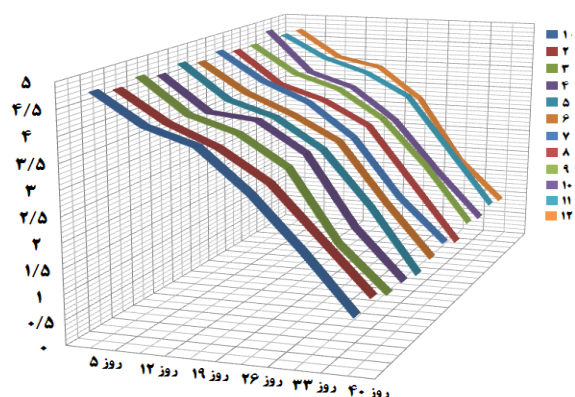
پنجم پس از بروز عفونت یعنی زمانی که بیش‌ترین علائم بالینی عفونت آشکار شده بود، آغاز شد. در مدت چهل روز دوره‌ی درمان، اسانس مرزنجوش توسط یک آب پاش ساده در ناحیه‌ی ضایعه و اطراف آن اسپری شد. همچنین در گروه کنترل منفی، محلول نمکی نرمال به عنوان دارونما در طی دوره درمان استفاده شد. سپس هر هفت روز یکبار تغییرات ظاهری در بافت پوست از نظر پوسته پوسته شدن، قرمزی، زخم و ریزش مو مورد بررسی دقیق و عکسبرداری توسط دوربین دیجیتالی (Canon® 80D) قرار گرفت (۱۹، ۸ و ۷). بررسی تأثیر درمانی در گروه‌های مورد آزمایش به وسیله‌ی رتبه بندی ضایعات پوستی و همچنین کشت قارچی انجام شد. بر اساس تحقیقات گذشته، شش رتبه برای ارزیابی ضایعه‌ی پوستی در نظر گرفته شد که عبارتند از رتبه صفر: پوست سالم، بدون علائم عفونت که مو به طور کامل رشد کرده است؛ رتبه یک: پوست سالم، فاقد پوسته پوسته شدن و همچنین طول شاخه‌ی مو نیمه بلند است؛ رتبه دو: رشد مجدد موها بر سطح ضایعه همراه با اندکی پوسته پوسته شدن می‌باشد؛ رتبه سه: شامل شروع رشد موها، بدون قرمزی، اندکی پوسته پوسته شدن همراه با چند تکه ناحیه‌ی بدون مو است؛ رتبه چهار: شامل از دست رفتن کامل مو در ضایعه، وجود قرمزی مختصر پوستی و پوسته پوسته شدن واضح می‌باشد؛ رتبه پنج: شامل از دست رفتن کامل مو در ضایعه، آسیب پوستی گسترده، قرمزی شدید، پوسته پوسته شدن و وجود زخم در ناحیه‌ی مورد آزمایش است. در ادامه بررسی میکروسکوپی و کشت قارچی از موها و پوسته‌های تراشیده شده به ترتیب در روزهای ۳۳، ۴۰ و ۵۰ پس از آلوده‌سازی نیز انجام شد (۸، ۷ و ۶). برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های آماری (Kruskal-Wallis) و (ANOVA) در نرم افزار (SPSS) نسخه ۲۲ ویندوز استفاده شد.

نتایج

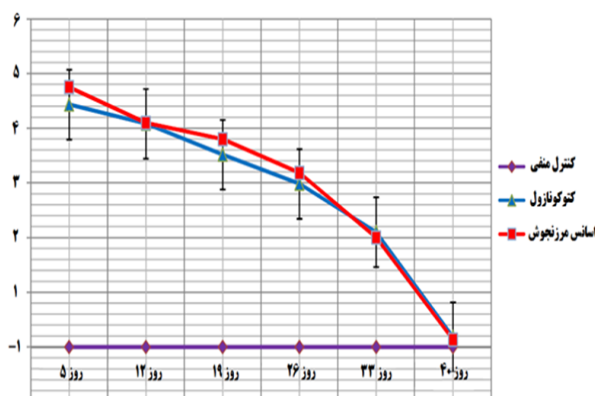
بررسی ظاهری ضایعات هر ۷ روز به وسیله‌ی تصویربرداری



نگاره ۱. تصاویر ضایعات پوستی در گروه‌ها و مقایسه‌ی زمانی روند بهبودی در آنها



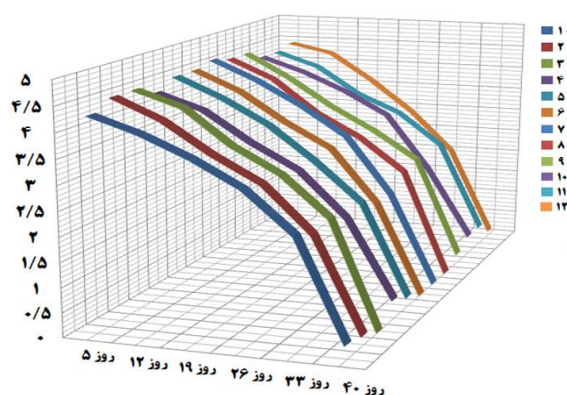
نمودار ۳ - رتبه‌های ضایعات پوستی گروه اسانس مرزنجوش در طول مدت درمان



نمودار ۱ - نمودار خطی میانگین رتبه‌های گروه‌های مختلف

جدول ۱ - درصد نتایج مثبت کشت قارچ گروه‌های اسانس مرزنجوش، کرم کتوکونازول و کنترل منفی در روزهای ۳۳، ۴۰ و ۵۰

روز	گروه	۵۰	۴۰	۳۳
اسانس مرزنجوش		٪۰	٪۰	٪۵۰
کرم کتوکونازول		٪۰	٪۰	٪۳۳
کنترل منفی		٪۰	٪۰	٪۰



نمودار ۲ - رتبه‌های ضایعات پوستی گروه کرم کتوکونازول ٪۲ در طول مدت درمان

بحث

به طور کلی درمان عفونت‌های درماتوفیتی می‌تواند به شکل موضعی و سیستمیک باشد که از نقطه نظر درمان بالینی داروهای موضعی سنگ بنای درمان هستند. در تحقیقات متعدد، خواص ضد قارچی عصاره‌های گیاهان مختلف آزمایش و اثبات شده است و در این مطالعه نیز اسانس گیاه مرزنجوش برای درمان بیماری درماتوفیتوز ناشی از میکروسپوروم کنیس در گربه‌ها مورد ارزیابی بالینی قرار گرفت. مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی با بهره‌گیری از روش (M38-A) مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی تعیین شد که این روش به طور معمول و گسترده در تحقیقات قارچ شناسی کاربرد دارد. تمام گربه‌ها به غیر از گروه کنترل منفی به عفونت آلوده شدند. سپس زمانی که علائم بالینی بیماری کاملاً قابل مشاهده بود یعنی روز پنجم پس از آلوده سازی، درمان آغاز شد و به مدت ۴۰ روز ادامه پیدا کرد. تمام گربه‌های تحت درمان با اسانس مرزنجوش و کرم کتوکونازول ۲٪ در روز چهارم بهبود یافتند. میانگین رتبه‌ی ضایعات پوستی در روز ۵ (شروع درمان) برای همه‌ی گروه‌ها به غیر از گروه کنترل منفی بین ۴/۴ الی ۴/۸ بود. میانگین رتبه‌ی ضایعات پوستی در روز ۱۲ برای گروه درمان با اسانس مرزنجوش ۴/۰۸ و گروه کتوکونازول ۲٪، ۴/۱۰ بود. میانگین رتبه‌ی ضایعات پوستی در روزهای ۱۹، ۲۶، ۳۳ و ۴۰ پس از آلوده سازی برای گروه اسانس مرزنجوش به ترتیب ۳/۸۰، ۳/۱۸، ۲/۰۰ و ۰/۱۳ و برای گروه کرم کتوکونازول به ترتیب ۳/۵۱، ۲/۹۸، ۲/۱۰ و ۰/۱۸ ارزیابی شد. در تجزیه و تحلیل اطلاعات مشخص گردید که اختلاف معنی‌داری در روزهای ۱۹، ۲۶ و ۴۰ پس از آلوده سازی بین گروه تحت درمان با اسانس مرزنجوش با کرم کتوکونازول ۲٪ وجود دارد ($p < 0.05$). همچنین روند کاهشی میانگین رتبه‌ی ضایعات پوستی در گروه‌ها به ترتیب با سه آزمایش قارچ متوالی ارزیابی شد به این صورت که نتایج هر سه کشت متوالی قارچ برای گروه کنترل منفی، منفی به دست آمد و برای گروه اسانس

مرزنجوش در روز ۳۳ پس از آلوده سازی در ۵۰٪ موارد مثبت و برای گروه کرم کتوکونازول در ۳۳٪ موارد مثبت و در روزهای ۴۰ و ۵۰ پس از آلوده سازی برای کلیه‌ی گروه‌های درمانی منفی شد. شایان ذکر است که تأثیر خواص ضد قارچی گیاهان مختلف در گونه‌های مختلف حیوانات توسط مطالعات بالینی سال‌های اخیر به اثبات رسیده است (۱۰، ۸ و ۷). بر اساس تحقیق Mugnaini و همکاران در سال ۲۰۱۳، درمان موفقیت آمیز بیماری درماتوفیتوز در گوسفند توسط اسانس گیاه مرزنجوش مشخص گردید و همچنین در این مطالعه درمان بیماری درماتوفیتوز ناشی از قارچ تریکوفیتون توسط اسانس گیاه مرزنجوش بهتر از درمان‌های مرسوم ارزیابی شد (۱۰). در مطالعه‌ی دیگری توسط Nadábia Almeida و همکاران در سال ۲۰۱۰، اثرات اسانس گیاه مرزنجوش بر ضد قارچ میکروسپوروم کنیس مورد تأیید قرار گرفت (۱۱). بنا به یک تحقیق در سال ۲۰۰۶ که Inouye و همکاران انجام دادند، خواص ضد قارچی اسانس گیاه مرزنجوش بر ضد قارچ تریکوفیتون منتاگروفیتس (*T. mentagrophytes*) به اثبات رسید (۵). با توجه به نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر و همچنین بر اساس مطالعات گذشته نشان داده شد که درمان بیماری درماتوفیتوز ناشی از قارچ میکروسپوروم کنیس توسط اسانس گیاه مرزنجوش در یک دوره‌ی زمانی مشخص، تأثیر و نتیجه‌ی بالینی مشابهی با درمان توسط کرم کتوکونازول ۲٪ دارد بنابراین اسانس گیاه مرزنجوش می‌تواند جایگزین مطمئن و مؤثری برای کرم کتوکونازول ۲٪ محسوب شود که البته تحقیقات بیشتر و وسیع‌تر بالینی لازم است تا بتوان این نتایج را به طور کلی و عمومی در بیماران مبتلا به درماتوفیتوز ناشی از قارچ میکروسپوروم کنیس در انسان و دام مورد استفاده قرار داد.

فهرست منابع

1. De Falco E. Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* L. under Different Growth Conditions. *Molecules*. 2013;18:14948-14960.
2. Fadel O, Ghazi Z, Mouini L, Charof R. Comparison of Microwave-Assisted Hydrodistillation and Traditional Hydrodistillation Methods for the *Rosmarinus eriocalyx* essential oils from Eastern Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*. 2011;2:112-117.
3. Fontenelle R, Morais SM, Brito HSE, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Lima YC, Brasil NVGPS, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG. Alkylphenol Activity against *Candida* spp. and *Microsporum canis*: A focus on the antifungal activity of thymol, eugenol and O-Methyl Derivatives. *Molecules*. 2011;16:6422-6431.
4. Ghannoum MA, Long L, Cirinol AJ, Miller AR, Najafi R, Wang L, Sharma K, Anderson M, Memarzadeh B. Efficacy of NVC-422 in the treatment of dermatophytosis caused by *Trichophyton mentagrophytes* using a guinea pig model, *International Journal of dermatology*. 2013;52:567–571.
5. Inouye S, Uchida K, Abe S. (2006). Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*; *Journal of Infection and Chemotherapy*, 12: 210-216.
6. Ivaskiene, M. Establishing the efficacy novel topical formulations in the treatment of experimental dermatophytosis in guinea pigs. *Veterinarija IR Zootechnika*. 2011;54:26-34.
7. Mashhady Rafie S, Baradaran Alizadeh S, Bayat M. Comparison of the Therapeutic effects of Nano-essence of Medical herb *Artemisia sieberi* with the ointment of Ketoconazole in guinea pig infected by *Microsporum canis*. *International Research Journal of Biological Sciences*. 2013;2:5-10.
8. Mashhady Rafie S, Chaharbaradari M, Bayat M. Comparison of Therapeutic effects of the *Myrtus communis* Nano-essence and Topical 1% terbinafine cream in Guinea pigs infected by *Microsporum canis*. *International Research Journal of Biological Sciences*. 2014;3:23-29.
9. Mozafarian V. Dictionary of Iran's plants. 1st ed. Tehran: Farhang Moaser; 1996.
10. Mugnaini L, Nardoni S, Pistelli L, Mancianti F. A herbal antifungal formulation of *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* for treating ovine dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycoses*. 2013;56:333–337.
11. Nadábia Almeida S. Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;46:499-508.
12. Neves I. J., Guerra J, Gamble W. Histopathologic and mycologic aspects of experimental infection of guinea pigs with *Microsporum canis*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2002;39:238-242.
13. Raafat D, Sahl HG. Chitosan and its antimicrobial potential- a critical literature survey. *Microbial biotechnology*. 2009;2:186-201.
14. Rochette F, Engelen M, Vanden Bosche H. Antifungal agents of use in animal health – practical applications. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2003;26:31-53.
15. Rodrigues C, Miranda KC, Fernandes OFL, Sosres AJ. In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania Brazil against five antifungal agents by broth microdilution method. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2009;51:9-12.
16. Saunte DM, Hasselby JP, Brillowska-Dabrowska A., Arendrup MC. Experimental guinea pig model of dermatophytosis: a simple and useful tool for the evaluation of new diagnostics and antifungals. *Medical Mycology*. 2008;46:303–13.

17. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Miller and Kirk's Small Animal Dermatology. 6th ed. Saunders, Philadelphia; Saunders; 2001.
18. Shimamura T, Kubota N, Shibuya K. Animal Model of Dermatophytosis, Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012;1155:1-11.
19. Sinha VR, Singla KA. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. International Journal of Pharmacology. 2004;274:1-33.
20. Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F, Carelle MS, Vijaya M. Anti-fungal activities of Origanum oil against Candida albicans. Molecular and Cellular Biochemistry. 2001;228:111-117.

