



İmmün Sistemi Baskılanmış Sıçanlarda *Cryptosporidium parvum*'un Nested PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

Demonstration of *Cryptosporidium parvum* in Immune Suppressed Rats Using Nested PCR

Hüseyin Can¹, Ayşe Caner², Mert Döşkaya², Aysu Değirmenci², Sabire Karaçalı¹, Yüksel Gürüz², Ahmet Üner²

¹Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada immün sistemi baskılanmış sıçanların dışkı ve akciğer örneklerinde Nested PZR ile *Cryptosporidium parvum* 18S small-subunit rRNA geninin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu gen bölgesi *Cryptosporidium* spp. için özgün olup, insanlardaki rutin enfeksiyonun tanısında kullanılabilir. (Türkiye Parazit Derg 2013; 37: 165-8)

Yöntemler: Bu çalışmada üç grup (n=4) *Rattus norvegicus* türü sıçan kullanılmıştır. Birinci ve ikinci grup sıçanların immün sistemlerinin baskılanması için sırasıyla deri altından ve ağızdan 12 hafta boyunca dexametazon uygulanmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir ilaç uygulanmamıştır. İmmün sistemi baskılanmış ve kontrol grubu sıçanlardan 12. hafta sonunda alınan akciğer ve dışkı örneklerinde Nested PZR ile *C. parvum* varlığı araştırılmıştır.

Bulgular: Ağızdan dexametazon uygulanan grubun dışkı ve akciğer örneklerinde *C. parvum* DNA'sı saptanmıştır. Buna karşın deri altından dexametazon uygulanan sıçan grubunun yalnızca dışkı örneklerinde *C. parvum* DNA'sı saptanmıştır. Kontrol grubu sıçanlarda herhangi bir bant paterni saptanmamıştır.

Sonuç: Bu çalışma sıçanlarda ağızdan dexametazon uygulamasının, deri altından uygulamaya göre daha yaygın cryptosporidiosis oluşumuna sebep olduğunu göstermiştir. Ayrıca immün sistemi baskılanmış hayvan veya insanlara ait dışkı ve solunum örneklerinde 18S small-subunit rRNA genine özgü Nested PZR testinin *Cryptosporidium* spp. tanısındaki etkinliği gösterilmiştir. (Türkiye Parazit Derg 2013; 37: 165-8)

Anahtar Sözcükler: *Cryptosporidium parvum*, Nested PZR, tanı, akciğer, dışkıoju

Geliş Tarihi: 17.07.2012

Kabul Tarihi: 16.05.2013

ABSTRACT

Objective: In the present study, the aim is to demonstrate *Cryptosporidium parvum* 18S small-subunit rRNA gene, in lung and stool samples of immune suppressed rats. This gene region is specific for *Cryptosporidium* spp. and thus can be used in humans for routine diagnostic procedures.

Methods: Three groups (n=4) of *Rattus norvegicus* rats were used. The first and second groups were administered dexamethasone, subcutaneously and orally, respectively, for 12 weeks. Rats in the control group were not immune suppressed. Lung and stool specimens were obtained from rats at the end of 12th week and examined for the presence of *C. parvum* DNA using Nested PCR.

Results: *C. parvum* DNA was demonstrated in lung and stool samples of rats which were immune suppressed by oral dexamethasone. On the other hand, *C. parvum* DNA was demonstrated only in stool specimens of the rats which were immune suppressed by subcutaneous dexamethasone. No band pattern was observed in the specimens of the control group.

Conclusion: The results of the study showed that oral dexamethasone administration was more efficient in generating disseminated cryptosporidiosis in rats compared to subcutaneous dexamethasone administration. In addition, Nested PCR targeting 18S small-subunit rRNA gene can be used to detect *Cryptosporidium* spp. in respiratory and stool specimens of animals and humans. (Türkiye Parazit Derg 2013; 37: 165-8)

Key Words: *Cryptosporidium parvum*, Nested PCR, diagnosis, lung, stool

Received: 17.07.2012

Accepted: 16.05.2013

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Ayşe Caner, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye Tel: +90 232 390 47 09 E-posta: ayse.caner@ege.edu.tr

doi:10.5152/tpd.2013.37

GİRİŞ

Cryptosporidium türleri insanlarda, evcil hayvanlarda ve vahşi omurgalılarda yaygın olarak saptanan parazitlerdir. Bu protozoonun konak çeşitliliğinin fazla olması sebebiyle cryptosporidiosis zoonotik bir hastalık olarak kabul edilmektedir (1). Bulaş direkt olarak enfekte kişilerle temas veya kontamine olmuş yiyecek ve içeceklerin tüketilmesiyle gerçekleşmektedir (2). Cryptosporidiosis immün sistemi sağlam bireylerde hafif diyareye sebep olurken, immün sistemi baskılanmış hastalarda yaşamı tehdit eden şiddetli diyare ve solunum sistemi enfeksiyonuna sebep olabilmektedir (3).

Günümüzde moleküler tanı tekniklerinin gelişmesiyle *Cryptosporidium* türlerinin arasındaki farklılıklar belirlenmiş ve bu sayede çeşitli hayvan türleri ile insanlar arasında *Cryptosporidium* spp. bulaşının olduğu gösterilmiştir (4, 5). Bugün için 20'den fazla *Cryptosporidium* türü tanımlanmış olup insanlarda sıklıkla *C. hominis* ve *C. parvum* enfeksiyona neden olmaktadır (6). *C. parvum*'un insan dışında birçok hayvan türünde de enfeksiyona yol açtığı bilindiğinden zoonotik bir tür olarak kabul edilmektedir (7).

İnsanlarda *Cryptosporidium* spp. tanısı dışkı, balgam ve safra örneklerinde; mikroskopi, kültür, antijen arama, flow sitometri ve nükleik asit saptama teknikleri kullanılarak konulmaktadır (7). Genelde özel boyama yöntemleri içeren mikroskopik tanı yöntemleri yaygın olarak kullanılmakla beraber, salgın gibi durumlarda enfeksiyon kaynağının belirlenmesinde tür ayrımının da yapılabilmesi için moleküler yöntemler devreye girmektedir (8-10). *Cryptosporidium* türlerinin moleküler tanısında ve genotiplendirme çalışmalarında sıklıkla polimorfik bir gen olan 18S small-subunit rRNA (18S SS rRNA; 18 S küçük alt birim rRNA) bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile araştırılmaktadır (11, 12).

Bu çalışmada immün sistemi baskılanmış sıçanlara ait dışkı ve akciğer örneklerinde Nested PZR ile *C. parvum* 18S small-subunit rRNA geninin bir bölgesinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Bu çalışmada öncelikle kortikosteroid (deksametazon) uygulanarak sıçanların immün sistemi baskılanmış, daha sonra alınan dışkı ve akciğer dokusu örneklerinde Nested PZR ile *C. parvum* DNA'sı araştırılmıştır. Çalışmada oluşturulan hayvan modeli için Ege Üniversitesi Etik Kurul onayı alınmıştır (Onay No: 2011-2006).

1. Kullanılan hayvanlar ve alınan örnekler

Bu çalışmada kullanılan 2-3 aylık, 60-80 gr ağırlığındaki *Rattus norvegicus* türü erkek sıçanlar Ege Üniversitesi Deney Hayvanları üretim merkezinden alınmış, çalışma boyunca standart şartlarda bakılıp beslenmiştir. Bu çalışmada oluşturulan immün sistemi baskılanmış hayvan modeli daha önceden kullanılmıştır (13-16). Araştırma sırasında her biri 4 adet sıçan içeren 3 grup oluşturulmuştur. Birinci gruba haftada iki kez derialtından 1,5 mg (3 mg/hafta) deksametazon, ikinci gruba ise ağızdan 2 mg/lt deksametazon uygulanarak, sıçanların immün sistemi baskılanmıştır. İkincil enfeksiyonu önlemek amacıyla, her iki çalışma grubuna da ağızdan 500 mg/lt tetrasiklin verilmiştir. Dördüncü haftadan sonra tetrasiklinin dozu 1000 mg/lt'ye yükseltilmiş, bu uygulama 12 hafta boyunca sürdürülmüştür.

Çalışmaya kontrol grubu olarak dahil edilen üçüncü grup sıçanlara ise herhangi bir ilaç uygulanmamıştır.

Sıçanların tümüne 12. hafta sonunda ötenazi uygulanmış ve steril şartlarda alınan akciğer dokusu ve dışkı örnekleri etiketlenerek DNA ekstraksiyonu uygulanan kadar -20°C'de saklanmıştır.

2. DNA ekstraksiyonu ve Nested PZR

Sıçanlardan alınan akciğer örneklerinin DNA ekstraksiyonları QIAamp DNA mini kit, dışkı örneklerinin DNA ekstraksiyonu ise Zymo Research Fecal DNA kit ile üretici firmaların protokolü kullanılarak yapılmıştır. Nested PZR ile *C. parvum* 18S small-subunit rRNA genine özgü Nested PZR tarif edildiği gerçekleştirilmiştir (11, 12).

C. parvum'a ait 18S small-subunit rRNA geni (GENBANK No: AB513879.1) 1656 baz çiftinden oluşmaktadır. Nested PZR reaksiyonunda 18S small-subunit rRNA geni içinde birincil ürün olarak 1319 bp büyüklüğünde DNA parçası 5'-CCCATTCCTCGAAACAGGA-3' (forward primer, 21 nt) ve 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3' (reverse primer, 20 nt) primerleri kullanılarak izole edilmiştir. İkinci reaksiyonda birinci ürün içinde bulunan 834 bp büyüklüğünde DNA parçası 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3' (forward primer, 22 nt) ve 5'-GGAAGGGTTGTATTATTAGATAAAG-3' (reverse primer, 26 nt) primerleri ile çoğaltılmıştır.

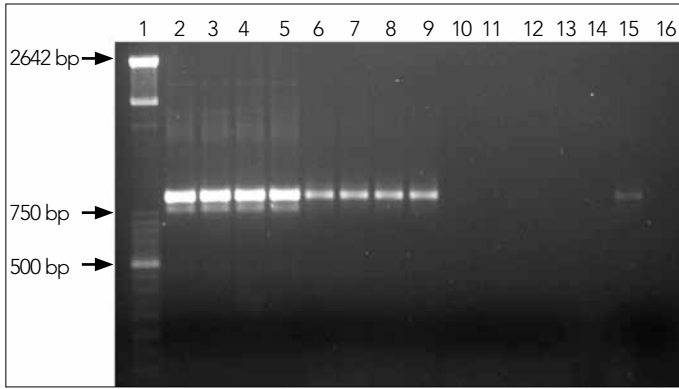
Nested PZR reaksiyonunun ilk aşamasında PZR karışımı (toplam hacim 100 µL) 10x tampon, 6 mM MgCl₂, 200 nM dNTP (Fermentas), her bir primerden 100 nM, 5 U Taq polimeraz (Fermentas) ve 1 µL kalıp DNA içermektedir. İkinci reaksiyon karışımında ilk karışımın 1 µL kalıp DNA alınmış ve 3 mM MgCl₂ kullanılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak, daha önceden PZR ile *C. parvum* DNA'sı saptanan örnek, negatif kontrol olarak da distile su kullanılmıştır.

Nested PZR amplifikasyon reaksiyonu iki farklı PZR cihazında gerçekleştirilmiştir. Her iki basamakta da, 94°C'de 3 dk. denatürasyon, 94°C'de 45 saniye, 55°C'de 45 saniye, 72°C'de 1 dk olmak üzere 35 döngü ve 72°C'de 7 dk. son uzama basamağı uygulanmıştır. Nested PZR reaksiyonundan elde edilen ürünler, DNA merdiveni ve kontroller %2 agaroz jele yüklendikten sonra elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Jel elektroforezi sonrası agaroz jel, ethidium bromide ile boyanmış ve elde edilen bant paternleri UV ışıkta görüntülenmiştir.

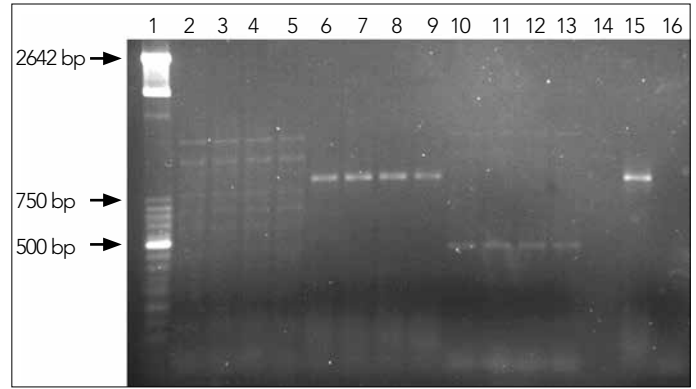
BULGULAR

Ağızdan ve derialtından kortikosteroid uygulanan iki grup ve kontrol grubu sıçanlardan, 12. hafta sonunda alınan akciğer ve dışkı örneklerine DNA ekstraksiyonu uygulanmıştır. Elde edilen toplam 24 DNA ekstraksiyonu örneğine *C. parvum* 18S small-subunit rRNA geni araştırılması amacıyla Nested PZR uygulanmıştır. Nested PZR ile derialtından deksametazon uygulanan sıçanların sadece dışkı örneklerinde *C. parvum* DNA'sı saptanırken, akciğer örneklerinde *C. parvum* DNA'sına gözlenmemiştir (Şekil 1, 2).

Nested PZR ile ağızdan deksametazon uygulanan sıçanların hem dışkı, hem de akciğer örneklerinin tamamında *C. parvum* DNA'sı saptanmıştır (Şekil 1, 2). Kontrol grubu sıçanlarından alınan örneklerin hiçbirinde *C. parvum* DNA'sı gözlenmemiştir (Şekil 1, 2).



Şekil 1. On ikinci haftanın sonunda alınan dışkı örneklerine uygulanan *C. parvum* 18S small-subunit rRNA PZR sonucunda elde edilen 825 bp ürünler. Sütun (1) DNA merdiveni (Roche); sütunlar (2-5): deri altından deksametazon uygulanan grup; sütunlar (6-9): ağızdan deksametazon uygulanan grup; sütunlar (10-13): negatif kontrol grubu; sütun (15): pozitif kontrol; sütun (16): negatif kontrol



Şekil 2. On ikinci haftanın sonunda alınan akciğer örneklerine uygulanan *C. parvum* 18S small-subunit rRNA PZR sonucunda elde edilen 825 bp ürünler. Sütun (1) DNA merdiveni (Roche); sütunlar (2-5): deri altından deksametazon uygulanan grup; sütunlar (6-9): ağızdan deksametazon uygulanan grup; sütunlar (10-13): negatif kontrol grubu; sütun (15): pozitif kontrol; sütun (16): negatif kontrol

TARTIŞMA

Cryptosporidium türlerinin immun sistemi sağlam kişilerde hafif gastrointestinal semptomlara, immun sistemi baskılanmış hastalarda ise şiddetli diyare ve solunum sistemi cryptosporidiosisine yol açması, etkeni ciddi bir halk sağlığı sorunu getirmektedir (17, 18).

Cryptosporidium türleri laboratuvar ortamında *in vitro* olarak üretilmektedir fakat kısa yaşam süreli olmaları yanında üretimin zor ve maliyetli olması nedeniyle sık kullanılmamaktadır. *In vivo* yöntemler ise *in vitro* koşullara göre, enfeksiyonun oluşturulmasının daha kolay olması ve insanlardaki enfeksiyona benzer bir model oluşturulabildiğinden dolayı daha sık tercih edilmektedir (19). *In vivo* çalışmalarda öncelikle sıçanlar tercih edilmekte ve immun sistemleri baskılandığında, cryptosporidiosis gelişmektedir. Bu hayvan modeli ile parazit konak ilişkisi, ilaç çalışmaları, antijen üretimi, genotiplendirme ve tanı çalışmaları yapılabilmektedir (13, 14, 20).

Bu çalışmada immun baskılanmanın 12. haftasında postmortem olarak alınan akciğer ve dışkı örneklerinde Nested PZR ile *C. parvum* 18S small-subunit rRNA geni araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ağızdan ve derialtından deksametazon uygulanan bütün sıçanların dışkı örneklerinde *C. parvum* DNA'sı saptanmış, akciğer örneklerinde ise sadece ağızdan deksametazon uygulanan sıçanlarda *C. parvum* DNA'sı gözlenmiştir. Kontrol grubu sıçanlarda ise akciğer ve dışkı örneklerinde *C. parvum* DNA'sı saptanmamıştır. Bu sonuçlara göre ağızdan deksametazon uygulamasının sıçanlarda yaygın respiratuvar cryptosporidiosis oluşturma açısından daha etkin olduğu saptanmıştır.

Üner ve ark. (13) sıçanların immun sistemlerini deksametazon ile deri altından baskılamış, ve 8. hafta sonunda postmortem olarak bağırsak içeriğini mikroskopik olarak incelenmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre immun sistemi baskılanan sıçanların %45'inde *Cryptosporidium* spp. oookistleri saptamışlardır. Habib ve ark. (21) sıçanların immun sistemini baskılamak için 8 hafta boyunca deri altından (haftada 2 kez) deksametazon uygulamışlar ve sonrasında *Cryptosporidium* spp. oookistleri ile enfekte etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre immun sistemi baskılanmış sıçanların %81,3'ünün dışkılarında boyama yöntemleri ile *Cryptosporidium* spp. oookistleri saptamışlardır. İmmun sistemi baskılanmış insanla-

rında solunum yolları örneklerinde *Cryptosporidium* türlerinin saptandığı çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Meamar ve ark. (22) tarafından yapılan çalışmada AIDS'li bir hastadan alınan dışkı ve balgam örneklerinde Nested PZR tekniği ile 18S small-subunit rRNA geni araştırılmış, bu hastanın hem dışkı, hem de balgam örneğinde *C. parvum bovine* genotipi saptanmıştır. Bir başka çalışmada da HIV pozitif bir hastanın balgam örneğinde boyama ve PZR yöntemiyle *C. hominis* bulunmuştur (18).

SONUÇ

Bu çalışmada, sıçanlarda ağızdan deksametazon uygulamasının, deri altından uygulamaya göre daha yaygın cryptosporidiosis oluşumuna sebep olduğunu göstermiştir. Ayrıca immun sistemi baskılanmış hastalarda cryptosporidiosis tanısında, dışkı örnekleri yanında solunum yolu örneklerinin de *C. parvum* varlığı açısından incelenmesi gerektiği ve tanı yöntemi olarak da rutin olarak uygulanan mikroskopik yöntemler yanında yukarıdaki çalışmalarda da belirtildiği gibi Nested PZR'nin kullanılmasının faydalı olacağı sonucuna varılmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Hakem değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden (2011-206) alınmıştır.

Yazar Katkıları

Fikir - A.C.; Tasarım - H.C., A.C.; Denetleme - M.D., Y.G., S.K.; Kaynaklar - H.C., A.D., A.Ü.; Malzemeler - H.C., A.C., M.D.; Veri toplanması ve/veya işleme - H.C., M.D., A.C.; Analiz ve/veya yorum - H.C., M.D., A.C., A.D., Y.G., A.Ü.; Literatür taraması - H.C., A.C., M.D., S.K.; Yazıyı yazan - H.C., A.C., M.D.; Eleştirel İnceleme - A.C., H.C., M.D., A.D., A.Ü., Y.G., S.K.; Diğer - A.C., H.C., M.D., A.D.

Teşekkürler

Bu çalışmaya destek olan Singleton Hastanesi Mikrobiyoloji Bölümü *Cryptosporidium* Referans Ünitesi ekibine teşekkür ederiz.

Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Ege University School of Medicine (2011-2006).

Author Contributions

Concept - A.C.; Design - H.C., A.C.; Supervision - M.D., Y.G., S.K.; Funding - H.C., A.D., A.Ü.; Materials - H.C., A.C., M.D.; Data Collection and/or Processing - H.C., M.D., A.C.; Analysis and/or Interpretation - H.C., M.D., A.C., A.D., Y.G., A.Ü.; Literature Review - H.C., A.C., M.D., S.K.; Writer - H.C., A.C., M.D.; Critical Review - A.C., H.C., M.D., A.D., A.Ü., Y.G., S.K.; Other - A.C., H.C., M.D., A.D.

Acknowledgement

We would like to thank the team of The Cryptosporidium Reference Unit at the Department of Microbiology of Singleton Hospital who support this work.

KAYNAKLAR

1. Xiao L, Feng Y. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 52: 309-23. [CrossRef]
2. Glaberman S, Moore JE, Lowery CJ, Chalmers RM, Sulaiman I, Elwin K, et al. Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 631-3. [CrossRef]
3. Gordon J Leitch, Qing He. Cryptosporidiosis-an overview. *J Biomed Res* 2012; 25: 1-16. [CrossRef]
4. Xiao L, Ryan UM. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr Opin Infect Dis* 2004; 17: 483-90. [CrossRef]
5. Hunter PR, Thompson RC. The zoonotic transmission of Giardia and Cryptosporidium. *Int J Parasitol* 2005; 35: 1181-90. [CrossRef]
6. Hadfield SJ, Robinson G, Elwin K, Chalmers RM. Detection and differentiation of Cryptosporidium spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 918-24. [CrossRef]
7. Üner A, Tanrıverdi S, Caner A, Değirmenci A. Cryptosporidium'lerde Moleküler Biyolojik Yapı ve Çalışmalar. Editörler, Özcel M.A, Tanyüksel M, Eren H. Moleküler Parazitoloji. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 22. 2009.s.631-43.
8. Ok ÜZ, Girginkardeşler N, Kilimcioğlu A, Limoncu E. Diğer Tanı Materyalleri ve Uygun Tanı Parazit Hastalıklarında Tanı. Editörler, Özcel, M.A. ve Altıntaş, N. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın no: 15. 1997.s.1-148.
9. Stroup SE, Roy S, Mchele J, Maro V, Ntabaguzi S, Siddique A. et al. Real-time PCR detection and speciation of Cryptosporidium infection using Scorpion probes. *J Med Microbiol* 2006; 55: 1217-22. [CrossRef]
10. Xiao L, Singh A, Limor J, Graczyk TK, Gradus S, Lal A. Molecular characterization of cryptosporidium oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1097-101. [CrossRef]
11. Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, et al. Phylogenetic analysis of Cryptosporidium parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 1578-83.
12. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Exp Parasitol* 2010; 124: 80-9. [CrossRef]
13. Üner A, İnceboz T, Uysalcı M, Dağcı H. Immune Deficiency and Cryptosporidiosis in Rats. *Turk J Vet Anim Sci* 2003; 27: 1187-91.
14. Üner A, Tappeh KH, Gürüz Y, Özbilgin A. Sıçanlarda Deneysel Olarak Pneumocystis carinii enfeksiyonu geliştirilmesi. *Türkiye Parazit Derg* 1994; 18: 291-5.
15. Dei-Cas E, Brun-Pascaud M, Bille-Hansen V. XX. Animal models of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 22: 163-8. [CrossRef]
16. Can H. İmmun Sistemi Baskılanmış Sıçanlarda Pneumocystis Pnömonisinin Etkeni Pneumocystis carinii'nin Mikroskopik ve Moleküler Tekniklerle Gösterilmesi. İzmir: Ege Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü. 2011.
17. Homem CG, Nakamura AA, Silva DC, Teixeira WF, Coelho WM, Meireles MV. Real-time PCR assay targeting the actin gene for the detection of Cryptosporidium parvum in calf fecal samples. *Parasitol Res* 2012; 110: 1741-5. [CrossRef]
18. Mercado R, Buck GA, Manque PA, Ozaki LS. Cryptosporidium hominis infection of the human respiratory tract. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 462-4. [CrossRef]
19. Brasseur P, Lemeteil D, Ballet JJ. Rat model for human cryptosporidiosis. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1037-9.
20. Ungar BL, Burriss JA, Quinn CA, Finkelman FD. New mouse models for chronic Cryptosporidium infection in immunodeficient hosts. *Infect Immun* 1990; 58: 961-9.
21. Habib KS, El Garhy MF. The pattern of cryptosporidiosis in experimentally immune deficient albino rats. *J Egypt Soc Parasitol* 2002; 32: 953-8.
22. Meamar AR, Rezaian M, Rezaie S, Mohraz M, Kia EB, Houpt ER, et al. Cryptosporidium parvum bovine genotype oocysts in the respiratory samples of an AIDS patient: efficacy of treatment with a combination of azithromycin and paromomycin. *Parasitol Res* 2006; 98: 593-5. [CrossRef]