

# JEDNOBUNĚČNÍ PARAZITI V PITNÝCH VODÁCH A METODY JEJICH DETEKCE

doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Biologické centrum AV ČR, v.v.i. - Parazitologický ústav  
a Přírodovědecká fakulta JU v Českých Budějovicích  
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice  
e-mail: oleg@paru.cas.cz

Paraziti jsou příčinou více než pětiny infekcí z pitné vody (waterborne infections) a mezi původci těchto nálezů dominují paraziti jednobuněční. V posledním desetiletí se výrazně začaly v jejich detekci uplatňovat molekulární metody; ty taky zasáhly do systematického zařazení. Některé obecně známé pojmy se vyprázdnily, příkladem mohou být např. „prvok“ nebo „bičikovec“. V tomto review respektuji platnou systematiku vyšších skupin organismů a podávám přehled jednobuněčných eukaryotických parazitů, jejichž zdrojem infekce může být pitná voda.

## Říše AMOEBOZOA - měňavkovci

Do této říše patří organismy měňavkovitého typu. Jejich panožky, tedy orgány pohybu, založené v podstatě na polymerizaci a depolymerizaci aktinu, jsou vždy lobopodiového či filopodiového typu, nikdy nemají axopodie ani typické retikulopodie. Pokud mají mitochondrie, tak jsou vždy s tubulárními kristami. Někteří zástupci mají bičíky. Z patogenů vyskytujících se v pitné vodě patří do této říše zejména **akantaméby** (z kmene Lobosea). Rod *Acanthamoeba* zahrnuje řadu druhů volně žijících ve vodním prostředí; z nich *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. palestinensis*, *A. polyphaga*, *A. quina* a *A. rhyodes* jsou schopny parazitického způsobu života. Tato schopnost je stálá vlastnost závislá především na termotoleranci a enzymové výbavě [1]. U člověka způsobují akantaméby dvě onemocnění: granulomatózní zánět mozku (GAE) a akantamébovou keratitidu. První z nich (vzácné, ale smrtelné) je onemocnění osob s sníženou imunitou a poškozuje nervovou tkáň, druhé onemocnění se vyskytuje zejména u osob nosících kontaktní čočky nebo s e zraněnou rohovkou a je mnohem častější. Sprchování teplou (i pitnou!) vodou je považováno za rizikový faktor infekce akantamébami při nošení měkkých kontaktních čoček.

O souvislosti akantamébových infekcí s vodou nejsou pochyby [2]. Epidemiologicky závažná je symbióza akantaméb s bakteriemi přežívajícími v jejich cytoplasmě. Protože akantaméby jsou schopny encystace a jejich cysty jsou mnohem odolnější vůči dekontaminaci a desinfekci než bakterie, ty je mohou využívat jako refugia pro přežití pro ně nepříznivých podmínek. Kromě nejružnějších nepatogenních bakterií mohou takto akantaméby hostit závažné patogeny, zejména legionely [3, 4], kampylobakterie [5] shigely [6], a vibria [7]. Detekce přítomnosti akantaméb v pitné vodě se dosud běžně neprovádí, molekulární metody pro jejich záchyt však již byly vypracovány [8].

Dalším kmenem z říše Amoebozoa je kmen Conosea, do něhož patří *Entamoeba histolytica*, **měňavka úplavičná**, původce amébové dyzentérie. Je geopolitně rozšířena, vyšší frekvence výskytu je v tropech a subtropích a v oblastech s nízkým hygienickým standardem. V České republice se vyskytuje do několika desítek případů ročně. K přenosu nákazy dochází nejčastěji fekálně-orální cestou, to znamená požitím

vody či potravin, které jsou kontaminované amébovými cystami. Hromadné výskyty amébové dyzentérie spojené s pitím kontaminované vody nepostihují velké skupiny jedinců, vyskytují se v zemích s nízkou hygienou, jinde jsou vzácné [9]. Detekce měňavek druhu *E. histolytica* ve vodě je limitována skutečností, že mnohem více rozšířena je *E. dispar*, morfologicky nerozlišitelná, ale nepatogenní. Smysl má tedy pouze molekulární detekce nebo sérologická, schopná oba druhy rozlišit [10].

### Říše EXCAVATA

Tato říše zahrnuje jednobuněčné organismy s bičíkem a ventrální rýhou (cytostomem), kterou zpětný bičík prochází. Slouží k získávání potravy, kterou přináší proud vody poháněný bičíkem opatřeným ploutvičkami.

Do této říše náleží kromě mnoha jiných i kmen metamonády (Metamonada) s třídou Diplomonadida, kam patří **lamblie střevní** (*Giardia intestinalis*). Je to nejčastější původce nevirových nekrvavých průjmů. Akutní fáze infekce je obvykle krátká a může být zaměněna s průjmem jiného původu. Dále lze pozorovat nauzeu, anorexii, pocity mrazení, mírně zvýšenou teplotu. Při vodnatém i prudkém průjmu není ve stolici krev, ale zvyšuje se obsah tuku a hlenu. Při protrahovaném průběhu akutního stadia se můžeme setkat s malabsorpcí a úbytkem hmotnosti. Může se vyskytovat zcela asymptoticky. Lamblie byly prvními eukaryotickými patogeny, v jejichž šíření byla rozpoznána role pitné vody. I v dnešní době působí téměř třetinu hromadných onemocnění z vody [11]. Na našem území výskyt tohoto onemocnění prudce klesl a setkáváme se spíše s importovanou giardiózou. Detekce cyst lamblí ve vodě je velmi dobře propracovaná a je relativně nejsnazší, protože cysty jsou dostatečně velké a charakteristické. Pozornost se zaměřuje na zjišťování životaschopnosti [12]. Ani v případě lamblí se však neobejdeme bez molekulární genotypizace, protože různé genotypy mají různou klinickou manifestaci a jen některé jsou přenosné na člověka [13]. Molekulární metody mohou být využity i k přímé detekci lamblí ve vodě [14].

Do říše Excavata patří i kmen Heterolobosea, do kterého jsou řazeny **naeglerie** (*Naegleria fowleri*). Tento améboflagelát není příbuzný akantamébám, i když životní cykly mají podobné a bývají společně nazývány „amfizoické améby“. Naeglerie působí primární amébovou encefalitidu (PAM), kdy proniknou do těla obvykle nosní dutinou, buď ve stadiu amébovém, nebo (pravděpodobněji) bičíkatém, které plove ve vodním sloupci. Po proniknutí do těla následně měňavková stadia prochází skrz sliznici a podél čichového nervu se dostávají do mozku. Zde způsobují lýzi mozkových buněk a zánět, brzy poté kóma a smrt. Nemoc je u nás dobře známa od epidemie v letech 1963-1965 v Ústí nad Labem, kdy zemřelo 16 mladých lidí, kteří se nakazili v plaveckém bazénu [15]. Naeglerie se v povrchových vodách vyskytují zcela běžně, virulentní jsou jen termorezistentní kmeny: v epidemiologii hraje roli tepelné znečištění např. chladicími vodami z elektráren a teplé bazény. Detekce naeglerií ve vodách se provádí jen ojediněle [16, 17].

### Říše CHROMALVEOLATA

Tuto říši je těžké charakterizovat společnými znaky a pravděpodobně to nebude nutné, protože se množí důkazy o tom, že není monofyletická a brzy se rozpadne na několik skupin. Jednou ze skupin je kmen Alveolata, do kterého patří mimo jiné i kokcidie a kryptosporidie.

**Kokcidie** jsou vnitrobuněční paraziti zvířat a lidí. Jako druhy asociované s pitnou vodou (waterborn) bývají uváděny *Cyclospora cayetanensis* a *Isospora belli* [18] a

někdy dokonce toxoplasma *Toxoplasma gondii* [11]. Toxoplasma je původce toxoplasmózy a člověk se infikuje mnohem častěji syrovým masem nebo kočičím trusem; kontaminovaná voda hraje v její epidemiologii zanedbatelnou roli. *Isospora belli* je původcem nekrvavých průjmů a vyskytuje se ve špatných hygienických podmínkách v souvislosti s válečnými konflikty. V poslední době se o ní hovoří spíše jako o původci oportunních onemocnění, ale i mezi nimi je vzácná. Voda jako zdroj infekce je spíše jen předpokládána, i když je zdrojem pravděpodobným. Naopak, u cyklospory *Cyclospora cayetanensis* byla role pitné i užitkové vody opakovaně prokázána. Onemocnění je známo z Nepálu, Peru, Mexika a dalších středoamerických zemí, od roku 1995 je každoročně diagnostikováno v USA [18]. Detekce oocyst může být buď mikroskopická za pomoci zviditelnění označenými protilátkami nebo s použitím autofluorescence, dnes však již převažuje diagnostika molekulární [19].

Ke kokcidiím byly v minulosti řazeny i **kryptosporidie**. Dnes je však známo, že jsou příbuznější gregarinám [20]. Na rozdíl od ostatních příslušníků kmene Apicomplexa nebyl u kryptosporidií jednoznačně prokázán apikoplast (zbytek plastidu získaného během evoluce od endosymbionta), i když bylo nalezeno minimálně 7 genů pravděpodobně z apikoplastu pocházejících. Dalších minimálně 24 genů pochází pravděpodobně z prokaryotického endosymbionta [21]. Kryptosporidie mají silně redukováný zbytek mitochondrie [22].

Z řady druhů kryptosporidií byly jako patogeni člověka rozpoznány následující střevní kryptosporidie: *Cryptosporidium parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis* a *C. suis* a žaludeční kryptosporidie *C. muris* a *C. andersoni*. Působí kryptosporidiózu, která se projevuje projevuje vodnatými průjmy. U imunokompetentních jedinců po krátké prepatentní periodě (4–6 dní, při vysoké infekční dávce 3 dny) nastupuje patentní perioda (6–18 dní); perioda vodnatých průjmů je o něco kratší (4–10 dní v typických případech) a dojde k samovolnému vyléčení. Kromě průjmů se v různé míře přidávají další příznaky: kolikové bolesti břicha, nauzea, vomitus, flatulence, zvýšená teplota, nechutenství až anorexie a váhový úbytek. U některých jedinců může infekce proběhnout bez patentních příznaků [23]. U imunodeficitních jedinců bývá průběh onemocnění odlišný. Rozdíl se projevují již na buněčné úrovni: v mnohem větší míře je kolem infikovaných buněk pozorována zánětlivá infiltrace. Patentní perioda se prodlužuje na mnoho týdnů i měsíců a v tomto období se střídají fáze s průjmy s relativně klidnými fázemi, kdy jsou kryptosporidie přítomny ve formované stolici. Onemocnění je chronické a nejeví tendenci k samovolnému vyléčení, naopak, často diseminuje do dalších orgánů. V první řadě se šíří do dalších úseků zažívacího traktu, směrem kraniálním (duodenum, žaludek, jícen) i kaudálním (caecum, colon, rectum). Dále postihuje sliznice žlučovýchodů, vývody pankreatu a dýchací trakt. Průběh onemocnění závisí na stupni imunodeficience, u těžkých případů, např. u pacientů s rozvinutým AIDS (počet CD4+ lymocytů  $\leq 200$  v  $1 \text{ mm}^3$  krve) dochází ke generalizaci a ke smrti následkem metabolického rozvratu [24].

Pokud jde o identifikaci původců epidemií kryptosporidiózy z vody, převažuje *C. hominis*, na druhém místě je opět *C. parvum* a na třetím *C. meleagridis*. Nejsou výjimkou ani případy, že se na epidemii podílejí 2 nebo 3 druhy. Celkově je tedy voda nejzávažnějším rizikovým faktorem a nejvýznamnějším zdrojem kontaminace vody jsou splašky obsahující lidské fekálie [25]. Nemusí vždy jít o vodu pitnou; např. v roce 2000 proběhla v Ohio epidemie kryptosporidiózy (původce *C. hominis* i *C. parvum*), která postihla 700 lidí a hlavní rizikový faktor bylo plavání v bazénu [26]. Detekce kryptosporidií se v poslední době značně zjednodušila: díky citlivým molekulárním

metodám se snížil objem filtrované vody a test umožní určit viabilitu kryptosporidií a zároveň následnou genotypizaci střevních druhů [27].

## Říše OPISTHOKONTA

Největší skupina eukaryot (přes 2 miliony popsaných druhů), jde o heterotrofní, často mnohobuněčné organismy. Mají jediný tlačný bičík (alespoň u některých buněk, např. u spermii, někdy ale bičík druhotně ztratily, např. většina hub). Převládá u nich typ mitochondrií s plochými kristami a syntetizují chitin. Jako zásobní látku využívají glykogen. Dvě hlavní skupiny opisthokont jsou houby a živočichové. Z patogenních hub se v pitných vodách vyskytují především **mikrosporidie** (kmen *Microspora*). Je to výhradně parazitická skupina. Mají 70S ribozomy (podjednotky rRNA mají 16S a 23S). Chybějí jim centrioly i jakékoliv respirační orgány. Jsou to především paraziti hmyzu, ryb, ale taky obratlovců. Mikrosporidie byly považovány za prvky nejistého systematického zařazení. Studium sekvencí  $\beta$ -tubulinu odhalilo, že mikrosporidie jsou více příbuzné houbám (Fungi) než živočichům [28]. Tato zpočátku překvapivá hypotéza byla opakovaně potvrzována výzkumem sekvencí dalších genů [29].

Mikrosporidie parazitující u obratlovců jsou intenzivně studovány v souvislosti s epidemií AIDS. Projevují se totiž jako typičtí oportunní paraziti: postihují pacienty s imunodeficiencí a působí jim závažné infekce, které posléze diseminují do celého organismu a pokud nejsou léčeny, jsou smrtelné. Jako patogeny člověka byly identifikovány *Encephalitozoon cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Vittaforma corneae*, *Trachipleistophora hominis*, *T. antropophthera*, *Pleistophora ronniae*, *Anncaliia algerae*, *A. connori* a *A. vesicularum*.

V roce 1998 byly mikrosporidie nalezeny v povrchových vodách, včetně 2 nejzávažnějších střevních patogenů, *Ent. bieneusi* a *E. intestinalis*, ale též jen ojediněle nalézaného druhu *V. corneae* [30]. Nález byl v té době překvapivý a zpočátku nebudil důvěru, protože tyto druhy byly v té době považovány za výhradní parazity člověka a masivní kontaminace vody lidskými fekáliemi nebyla pravděpodobná. Později byly podobné nálezy zopakovány [31, 32] a také byly nalezeny zvířecí rezervoáry obou střevních druhů mikrosporidií. Byl zaznamenán též hromadný výskyt střevní mikrosporidie u imunokompetentních i imunodeficientních jedinců epidemiologicky související s pitnou vodou [33]. Dnes jsou mikrosporidie považovány za typické „waterborn“ parazity [34]. Pokud jde o detekci mikrosporidií ve vodě, existuje řada metod prokazujících buď přímo spory mikrosporidií (většinou koncentrované imunomagnetickou separací a zviditelněné imunofluorescencí) nebo metod molekulárních prokazujících DNA příslušného druhu mikrosporidie [35]. Nález spor mikrosporidií ve vodě bez potvrzení molekulárními nebo aspoň serologickými metodami nemá prakticky žádný význam vzhledem k množství mikrosporidií vodních bezobratlých a ryb, jejichž spory mohou být ve vodě přítomny. Zatímco běžný člověk s nepoškozeným imunitním systémem se zřejmě nemusí infekce mikrosporidii obávat (podle našich dosud nepublikovaných výsledků jsou mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* běžně přítomny v malém množství i ve zcela zdravých lidech, pro lidi s poškozenou imunitou představují vážné nebezpečí).

## ZÁVĚRY

Infekce parazity získané pitím vody sice postihují zejména obyvatele zemí, ve kterých jsou nižší hygienické standardy a nedostatek kvalitní pitné vody, ale ani obyvatelé vyspělých zemí nejsou těchto infekcí ušetřeni. Zdravotní rizika se liší u jednotlivých

původců a protože mezi ně patří i původci oportunních parazitóz, nejvíce ohroženou skupinou jsou jedinci s poruchou imunitního systému. Metody detekce těchto organismů prošly v posledních letech výrazným vývojem. Jsou odvozeny od moderních diagnostických metod a v současnosti převažují metody molekulární. Tento vývoj přinesl na jedné straně značné zvýšení citlivosti a záchytnosti, na druhé straně v některých případech potíže s interpretací pozitivních výsledků. Jsou však vyvíjeny nové detekční metody umožňující zároveň určit životaschopnost a dokonce i infektivitu příslušného agens. Lze očekávat, že se v blízké budoucnosti sjednotí metody izolace DNA pro jednotlivé parazity a jediný takto získaný vzorek pak bude použit na PCR s mnoha dvojicemi primerů amplifikujícími DNA všech významných parazitických organismů včetně prokaryotických.

## Literatura

1. Walochnik J. , Haller-Shoeber E. M. , Kölli H. , Pichler O. , Obwaller A. , Aspöck H. 2000: Discrimination between Clinically Relevant and Nonrelevant *Acanthamoeba* Strains Isolated from Contact Lens-Wearing Keratitis Patients in Austria. J. CLIN. MICROBIOL. 38: 3932–3936.
2. Nwachuku N. , Gerba Ch. P. , 2006: Health Effects of *Acanthamoeba* spp. and Its Potential for Waterborne Transmission. In: REVIEWS OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY 180, Springer New York: 93-131.
3. Barker J. , Brown M. R. , Collier P. J. , Farrell I. , Gilbert P. . , 1992: Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 58: 2420-2425.
4. Winiacka-Krusnell J, Linder E, 1999: Free-living Amoebae Protecting Legionella in Water: The Tip of an Iceberg? SCANDINAVIAN J. INFECT. DIS. 31: 383 – 385
5. Axelsson-Olsson D. , Waldenstrom J. , Broman T. , Olsen B. , Holmberg M. , 2005: Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 71: 987–992.
6. Saeed, A. , Abd H. , Edvinsson B. , Sandström G. , 2009: *Acanthamoeba castellanii* an environmental host for *Shigella dysenteriae* and *Shigella sonnei*. ARCH. MICROBIOL. 191: 83–88.
7. Thom S. , Warhurst D. , Drasar B. S. , 1992: Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. J. MED. MICROBIOL. 36: 303–306.
8. Boost M. , Cho P. , Lai S. , Sun W. M. , 2008: Detection of acanthamoeba in tap water and contact lens cases using polymerase chain reaction. OPTOM. VIS. SCI. 85: 526-530.
9. Andersson, Y. and de Yong, B. , 1989: An outbreak of giardiasis and amoebiasis at a ski resort in Sweden. WAT. SCI. TECHNOL. 21: 143–146
10. Gonin P. , Trudel L. , 2003: Detection and Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* Isolates in Clinical Samples by PCR and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J. CLIN. MICROBIOL. 41: 237-241
11. Karanis P. , Kourenti Ch. , Smith H. , 2007: Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. J. WATER AND HEALTH 5: 1-38
12. Jarney-Swan C. , Gibbs M. , Ho G. E. , Bailey I. W. , and Howgrave-Graham A. R. , 2000: A novel method for detection of viable Giardia cysts in water samples. WATER RESEARCH 34: 1948-1951.
13. Homan, W. L. and Mank, T. G. , 2001: Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. INT. J. PARASITOL. 31: 822–826
14. Mahbubani M. H. , Bej A. K. , Perlin M. , Schaefer F. W. , Jakubowski W. , Atlas R. M. , 1991: Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 12: 3456–3461.
15. Červa L., Novák K. 1968: Amebic meningoencephalitis: sixteen fatalities. SCIENCE 160: 92.
16. Marciano-Cabral F. , MacLean R. , Mensah A. , LaPat-Polasko L. , 2003: Identification of *Naegleria fowleri* in domestic water sources by nested PCR. APPL ENVIRON MICROBIOL. 69: 5864–5869.

17. Pelandakis, M. , Pernin, P. , 2002: Use of Multiplex PCR and PCR Restriction Enzyme Analysis for Detection and Exploration of the Variability in the Free-Living Amoeba Naegleria in the Environment. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 68: 2061-2065
18. Marshall M. M. , Naumovitz D. , Ortega Y. , Sterling C. R. , 1997: Waterborne protozoan pathogens. CLIN. MICROBIOL. REV. : 10: 67–85.
19. Lalonde L. F. and Gajadhar A. A. 2008: Highly Sensitive and Specific PCR Assay for Reliable Detection of *Cyclospora cayetanensis* Oocysts. APPL ENVIRON MICROBIOL. 74: 4354–4358.
20. Carreno R. A. , Martin D. S. , Barta J. R. , 1999: *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. PARASITOL. RES. 85: 899-904.
21. Zhu G. , Marchewka M. J. , Keithly J. S. , 2000: *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. MICROBIOLOGY-UK 146: 315-321.
22. Beyer T. V. , Svezhova N. V. , Sidorenko N. V. , Khokhlov S. E. , 2000: *Cryptosporidium parvum* (Coccidia, apicomplexa): Some new ultrastructural observations on its endogenous development EUR. J. PROTISTOL. 36: 151-159.
23. Hunter P. R. , Hughes S. , Woodhouse S. , Raj N. , Syed Q. , Chalmers R. M. , Verlander N. Q. et Goodacre J. , 2004: Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. CLIN. INFECT. DIS. 39: 504-510
24. Manabe Y. C. , Clark D. P. , Moore R. D. , Lumadue J. A. , Dahlman H. R. , Belitsos P. C. , Chaisson R. E. , Sears C. L. , 1998: Cryptosporidiosis in patients with AIDS: Correlates of disease and survival. CLIN. INFECT. DIS. 27: 536-542.
25. Fayer R. , 2004: *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. VETER. PARASITOL. 126: 37-56
26. Mathieu E. , Levy D. A. , Veverka F. , Parrish M. K. , Sarisky J. , Shapiro N. Johnston S. , Handzel T. , Hightower A. Xiao L. H. , Lee Y. M. , York S. , Arrowood M. , Lee R. , Jones J. L. , 2004: Epidemiologic and environmental investigation of a recreational water outbreak caused by two genotypes of *Cryptosporidium parvum* in Ohio in 2000. AM. J. TROP. MED. HYG. 71: 582-589.
27. Wagner-Wienin C. and Kimmig P. , 1995: Detection of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts by PCR. APPL. ENVIRON. MICROBIOL 61: 4514-4516.
28. Edlind T. D. , Li J. , Visvesvara G. S. , Vodkin M. H. , McLaughlin G. L. , Katiyar S. K. , 1996: Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. MOL. PHYLOGEN. EVOL. 5: 359-367.
29. Thomarat F, Vivares CP et Gouy M, 2004: Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes, J. MOL. EVOL. 59: 780-791
30. Dowd, S, E. , Gerba, Ch. P. , Pepper, I. L. 1998: Confirmation of the Human-Pathogenic Microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in Water. APPL. ENVIRONM. MICROBIOL. 64: 3332-3335.
31. Fournier S. , Dubrou S. , Liguory O. , Gaussin F. , Santillana-Hayat M. , Sarfati C. , Molina J. M. , Derouin F. , 2002: Detection of Microsporidia, cryptosporidia and *Giardia* in swimming pools: a one-year prospective study, FEMS IMMUNOL. MED. MICROBIOL. 33: 209–213.
32. Coupe S. , Delabre K. , Pouillot R. , Houdart S. , Santillana-Hayat M. , Derouin F. , 2006: Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in surface water, including recreational areas: a one-year prospective study. FEMS IMMUNOL. MED. MICROBIOL. 47: 351-359.
33. Cotte L. . Rabodonirina M. , Chapuis F. , Bailly F. , Bissuel F. , Raynal C. , Gelas P. , Persat F. , Piens M. A. , Trepo C. , 1999: Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. J. INF. DIS. 180: 2003-2008.
34. Didier E. S. , Stovall M. E. , Green L. C. , Brindley P. J. , Sestak K. , Didier P. J. , 2004: Epidemiology of microsporidiosis: source and modes of transmission. VET. PARASITOL. 126:145–166
35. Dowd S. E. , Gerba C. P. , Kamper M. , Pepper I. L. , 1999: Evaluation of methodologies including immunofluorescent assay (IFA) and the polymerase chain reaction (PCR) for detection of human pathogenic microsporidia in water. J. MICROBIOL. METH. , 35: 43-52.