

L'EAU DANS LA VILLE

Cyclospora cayetanensis et sa présence en milieu hydrique à Hanoï (Vietnam). Étude dans l'environnement (eaux de forage, lacs et rivières).

M. Miegville (1), V. Koubi (1), L. C. Dan (2), J. P. Barbier (3) & P. D. Cam (2)

(1) Institut de biologie, Laboratoire de parasitologie, 9, quai Moncoussu, 44035 Nantes Cedex 1, France.

(2) Institut national d'hygiène et d'épidémiologie, 1 Yersin street, Hanoi, Vietnam.

(3) ASTRAN (Asia Pacific Technology and Research Network), Suite 9.03.9 th floor,

Menera Keek Seng, n°203, Jalan Bukit Bintang, 55100 Kuala Lumpur, Malaisie.

Manuscrit n°DK/26. 6ème congrès international francophone de médecine tropicale "Santé et urbanisation en Afrique" (Dakar, octobre 2001). Accepté le 25 septembre 2002.

Summary: Cyclospora cayetanensis presence in aquatic surroundings in Hanoi (Vietnam).

Environmental study: deep drillings, lakes and river waters.

Cyclospora cayetanensis is a pathogenic agent originating from the intertropical zone. It causes diarrhoeal diseases in local populations as well as in travellers visiting these zones.

In the first part of this work, an epidemiological study on drinking water supply (reservoirs and consumers'taps) was conducted in Hanoi over 12 months; samples were daily collected and have revealed the presence of Cyclospora cayetanensis oocysts during the whole year in tanks and only during monsoon season. Molecular methods were used for species identification.

In the second part, we tried to investigate different water sources in Hanoi city in order to detect Cyclospora cayetanensis environmental contamination: groundwaters, surface waters collected in lakes and rivers and also waters from treatment plants. Our results show that none Cyclospora cayetanensis oocyst was found in the groundwaters and in the disinfected finished waters after treatment. In contrast, in rivers and lakes samples, the level of positivity reached about 63.6% with significant differences between the districts regarding the rates of oocysts recovery: only 24% positive specimens in Hoan Kiem district, whilst respectively 80.4%, 78.3% and 65% positive samples in Hai Ba Trung, Dong Da and Ba Dinh districts.

The results of this study seem to confirm that environmental water is contaminated by Cyclospora cayetanensis oocysts and points out the importance of water as a significant source of human transmission. It is quite obvious that observation could be probably extended to the other endemic areas.

Résumé :

Cyclospora cayetanensis, agent pathogène de la zone intertropicale, est à l'origine de diarrhées, touchant aussi bien la population locale que les voyageurs de retour de zones d'endémies.

Au cours d'une première étude épidémiologique à Hanoi, portant sur le réseau de distribution (réservoirs et robinets), des prélèvements quotidiens effectués sur 12 mois ont permis de montrer la présence des oocystes de Cyclospora durant toute l'année dans les réservoirs et seulement durant la mousson au niveau des robinets. L'identité d'espèce a été rendue possible grâce aux techniques de biologie moléculaire.

Avec ce travail, nos investigations se sont portées sur l'environnement (eaux de forage, usine de traitement, lacs et rivières de Hanoi). Nous avons pu montrer que les eaux de forage et les prélèvements réalisés jusqu'à la sortie de l'usine de traitement étaient négatifs en ce qui concerne les oocystes de C. cayetanensis.

Par contre, au niveau des lacs et rivières, nous avons globalement 63,6 % de prélèvements positifs, avec des différences significatives d'un quartier à l'autre (24 % de prélèvements positifs à Hoan Kiem, 80,4 %, 78,3 % et 65 % respectivement à Hai Ba Trung, Dong Da et Ba Dinh).

Cette étude met en évidence C.cayetanensis dans l'environnement et prouve que l'eau est la source probable de la contamination humaine. Cette constatation à Hanoi est probablement à étendre dans d'autres régions endémiques.

Cyclospora cayetanensis
epidemiology
environment
Hanoi
Vietnam
South East Asia

Cyclospora cayetanensis
épidémiologie
environnement
Hanoi
Vietnam
Asie du Sud-est

Introduction et rappels

C'est en 1870 que EIMER (6) découvre pour la première fois *Cyclospora* dans l'intestin d'une taupe. SCHNEIDER

(14) crée, dès 1881, le genre *Cyclospora*. Ce parasite fut dès lors observé chez de nombreux animaux.

Les premiers cas humains sont découverts, en 1979, par ASHFORD (1) en Nouvelle-Guinée, en étudiant une tribu de Papous.

La confirmation de l'espèce *Cyclospora* comme agent pathogène humain n'a été publiée qu'en 1989 (9).

La pathogénicité de cette coccidieuse semble modérée chez l'immunocompétent. Seule la primo-infection peut donner des diarrhées aiguës. Par contre, chez les patients immunodéprimés et tout particulièrement chez les sujets infectés par le VIH (CD4 < 100/mm³), ces diarrhées deviennent chroniques.

Parmi les symptômes classiques concernant plus de 80 % des malades, nous retrouvons la diarrhée qui, dans la majorité des cas, est subaiguë et aboutit à une guérison spontanée en quelques jours. Parfois, cette diarrhée prend une allure chronique ou cyclique (2). Les symptômes ne disparaissent alors qu'après plusieurs semaines, voire plusieurs mois.

Une baisse d'appétit, une asthénie, une perte de poids (pouvant atteindre près de 20 kg) avec une moyenne estimée à 3,6 kg (15) sont observées dans plus de 90 % des cas. D'autres symptômes sont fréquents (60 à 80 %), tels une distension abdominale, des coliques, des nausées, des myalgies et, dans la moitié des cas, un train fébrile évoquant un syndrome grippal. La transmission de *Cyclospora* par ingestion d'aliments contaminés a clairement été établie lors des épidémies survenues aux États-Unis et au Canada, en 1996-1997. Ce sont principalement des framboises du Guatemala qui ont été incriminées (4, 16).

Plusieurs épidémies bien documentées sont à l'origine de la mise en cause de l'eau dans la dissémination du parasite (7, 8, 11).

À Hanoï, l'eau émane de nappes phréatiques situées sous la ville. L'approvisionnement en eau de la ville se fait à partir de huit puits de forage d'une profondeur moyenne de 80 mètres. Après traitement, l'eau stockée dans des réservoirs est envoyée par des pompes dans le système de distribution. Ce réseau de canalisation mesure environ 600 km. La population est desservie de façon collective, un point d'eau alimentant plusieurs familles.

L'ancienneté du réseau d'eau potable a conduit la compagnie de distribution d'eau de Hanoï à une rénovation de celui-ci depuis quelques années. En effet, la grande majorité du réseau date de l'époque coloniale. Il est fréquent de rencontrer des canalisations percées, accidentellement ou volontairement. Il en résulte une dépression qui, associée aux brèches, favorise l'entrée des eaux de ruissellement dans les canalisations, particulièrement pendant la mousson.

Au cours d'une étude antérieure (3), nous avons analysé deux principaux foyers: l'eau des robinets dans les habitations d'Hanoï, ainsi que les réservoirs extérieurs servant également à l'approvisionnement. Nous avons pu montrer que les robinets étaient contaminés de façon fluctuante avec les saisons, avec la présence des oocystes uniquement durant la période des pluies. Par contre, les réservoirs externes contenaient de façon permanente les parasites qui, en l'absence de flux importants et par simple décantation, pouvaient y séjourner des mois.

Afin d'expliquer la contamination du système de distribution, au cours de notre nouvelle étude, nous avons recherché la présence de *Cyclospora* dans l'environnement en orientant nos recherches au niveau des nappes phréatiques, des lacs et des rivières de la capitale du Vietnam.

Matériel et méthode

Sélection des sites de prélèvements

Conformément à l'étude précédente (3), nous avons maintenu le découpage de la ville en quatre secteurs, correspondant aux quatre districts de Hanoï: Ba Dinh au nord-ouest, Hoan Kiem au nord-est, Dong Da au sud-ouest, Hai Ba Trung au

sud-est. Nous avons instauré un calendrier spécifiant quotidiennement les sites à prélever. Pour cela, dans chaque quartier, nous avons sélectionné des lacs et des rivières.

Afin d'avoir une répartition homogène des prélèvements suivant leurs origines et cela en fonction du temps, nous avons alterné, un jour sur deux, lac ou rivière, tout en changeant de quartier tous les deux jours. Cette méthode permet sur trois mois d'analyser tous les points d'échantillonnages des lacs et des rivières retenus pour les 4 districts.

Échantillons d'eau

Le volume recueilli a été différent en fonction des sites de prélèvement:

- 20 litres en ce qui concerne les nappes phréatiques et les différents points dans l'usine de traitement,
- 0,5 litre pour les lacs,
- 0,25 litre pour les rivières.

Ces volumes ont été déterminés après plusieurs essais en fonction de la turbidité de l'eau à analyser et du rendement de la méthode de filtration. Cette faible quantité d'eau prélevée au niveau des lacs et des rivières a été retenue pour des raisons organisationnelles et budgétaires, les filtrations de gros volume (100-150 litres) nécessitant la mise en œuvre d'un matériel lourd et nettement plus onéreux (pompe, capsule d'échantillonnage type envirocheck...).

Traitement des échantillons

La filtration est exécutée à l'aide d'une pompe à vide sur des membranes d'acétate de cellulose dont les pores ont un diamètre de 1,2 µ (réf: filtre type ME 28, 47 mm). Ces membranes sont ensuite récupérées, découpées en petits morceaux et mises en contact dans un tube à essai avec 4 ml de sérum physiologique. Cette préparation est alors broyée au vortex durant 5 minutes. La totalité du liquide physiologique est récupérée pour être centrifugée. Le culot final, remis en suspension dans 100 µl de sérum physiologique, est réparti sur quatre lames différentes, qui seront alors observées en totalité.

Un deuxième échantillon hydrique, prélevé au même moment sur le même site, après filtration sur membrane, centrifugation et récupération du culot, est conservé à - 20 °C dans l'attente de la lecture en microscopie optique pour être éventuellement, en cas de positivité, traité ultérieurement par la biologie moléculaire.

Étude microscopique

Deux analyses de l'échantillon sont réalisées:

- la première en microscopie optique en lumière naturelle qui recherche les oocystes entre lame et lamelle avec, dans le cas d'une positivité, un dénombrement des oocystes;
- la seconde comprend la confirmation du diagnostic grâce à la microscopie à fluorescence, *Cyclospora cayetanensis* étant caractérisé par une autofluorescence bleu-violet spontanée lors de son observation avec un filtre à 365 nm.

Étude en biologie moléculaire

En cas de positivité, les échantillons sont ramenés en France dans de la carboglace afin d'être traités, en ce qui concerne la biologie moléculaire, à l'Institut de biologie du CHU de Nantes.

À partir des échantillons positifs détectés par microscopie, une extraction de l'ADN selon la méthode de STURBAUM (17)

est réalisée par lavage avec du tampon PCR suivi de sept cycles d'ébullition/congélation. Un témoin négatif d'extraction est pratiqué à partir d'eau stérile. Les produits d'extraction sont conservés à - 20 °C.

Tableau I.

Amorces de la PCR nichée de <i>Cyclospora</i> . Niche PCR primers of <i>Cyclospora</i> .				
amorces	séquence nucléotidique (5' à 3')	taille (en pb)	position (AF 111183)	
CYC1FE	GGA ATT CCT ACC CAA TGA AAA CAG TTT	27	418-436	
CYC2RB	CGG GAT CCA GGA GAA GCC AAG GTA GG	26	1053-1035	
CYC3FE	GGA ATT CCT TCC GAG CTT CGC TGC GT	26	685-704	
CYC4RB	CGG GAT CCC GTC TTC AAA CCC CCT ACT G	28	978-959	

C'est ensuite une PCR nichée selon la méthode décrite par RELMAN (12) que nous avons retenue.

Les amorces utilisées pour la première PCR sont CYC1FE et CYC2RB et pour la seconde PCR, CYC3FE et CYC4RB (cf. tableau I). Le fragment amplifié est une portion de 294 paires de base (pb) de la petite sous-unité 18S de l'ARN ribosomique de *Cyclospora*.

L'amplification a lieu dans un thermocycleur omnigène (HyBAI D, Teddington, Royaume-Uni).

Après une dénaturisation à 95 °C pendant trois minutes, 30 cycles ont lieu. Chaque cycle correspond à une dénaturation à 94 °C pendant trente secondes, un annealing à 50 °C pendant une minute et une extension à 72 °C pendant trente secondes. Une extension finale a lieu à 72 °C pendant sept minutes.

Un témoin positif est réalisé à partir d'un échantillon fécal contenant des oocystes de *Cyclospora* et pour lequel la réalité de la contamination a été confirmée par séquençage du produit de PCR. Un témoin négatif est constitué à partir d'eau stérile. Cette PCR amplifie un fragment de 636 paires de bases.

La seconde PCR comporte aussi une dénaturation à 95 °C pendant trois minutes, puis trente cycles identiques à la première PCR. La température d'annealing est alors de 60 °C. Les produits de PCR obtenus sont analysés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 9 % et révélés sur ultraviolet après coloration au bromure d'éthidium. La taille des fragments amplifiés est donnée en comparaison avec un marqueur moléculaire (DNA molecular Weight Marker V 8-587 pb, Roche).

Les produits de PCR obtenus précédemment sont étudiés par séquençage. Ils sont purifiés, puis analysés par le Kit thermo Sequenase TMII Dye terminator cycle sequencing premix (Amersham, Les Ullis, France). Le séquençage est réalisé selon la technique décrite par SANGER (13). Les séquences sont ensuite comparées aux séquences publiées dans le Gen Bank disponible, sur le site du National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Résultats

Au total, 150 prélèvements ont été réalisés, dont 18 au niveau des nappes phréatiques et de l'usine de traitement, 64 au niveau des rivières et 68 au niveau des lacs, avec la répartition suivante :

- Ba Dinh au nord-ouest :
 - 6 lacs (1 site): Ho Tay, Giang Vo, Thu Le, Truc Bach, Thang Cong, Ngoc Kahn;
 - 1 rivière, To Lich (5 sites): Buoi road, Phan ke Binh street, Doi Can street, Cong Moc bridge, Buoi.

- Hoan Kiem au nord-est :

- 1 lac, Hoam Kiem (4 sites) : Bac, Nam, Dinh Tien, Pho le Tay.
- 1 rivière, Hong (3 sites): Tan Ap st., Phuc Tan st., Chuong Duong st.

- Dang Da au sud-ouest :

- 4 lacs (5 sites) : Ba Mau, Dong Da (2 points : Dong Da et Phia Tay), Xa Dan, Van Chuong.
- 2 rivières (3 sites): Lu (2 points: Nguyen Luong Bong st., Pham Ngoc Thach), Dong Da.

- Hai Ba Trung au sud-est :

- 4 lacs (5 sites): Thiem Quang, Bay Mau (2 points), Hay Ba Trung, Thang Nhan.
- 2 rivières (5 sites): Set (3 points: Dai Co Viet st., Hostel of Polytechnic university, Nguyen An Ninh st), Kim Nguu (2 points : Lac Trung bridge, Mai Dong market).

Les 18 prélèvements réalisés en amont du circuit de distribution (sortie du forage, avant et après le traitement au niveau de l'usine) ont été trouvés négatifs.

Bien que le nombre de prélèvements soit assez réduit, les volumes étudiés (20 litres par prélèvement), correspondant au double de ce que nous avons réalisé lors de notre étude au niveau des robinets, nous permettent de dire qu'il est probable qu'en amont de la distribution, l'eau soit indemne d'oocystes de *Cyclospora* sp.

Par contre, au niveau des lacs et des rivières, les prélèvements positifs furent très élevés. Nous avons eu globalement près de 63,6 % de prélèvements positifs au niveau de l'environnement (lacs et rivières). Contrairement à l'étude précédente, nous relevons des différences très significatives d'un district à l'autre (cf. tableau II).

On remarque que le quartier d'Hoan Kiem ne présente que 24 % de prélèvements positifs (tous sites confondus), alors que les quartiers de Dong Da et Hai Ba Trung sont, par contre, très positifs, avec respectivement 78,3 % et 80,4 % de prélèvements contenant des oocystes de *Cyclospora* sp.

Les lacs aux eaux stagnantes sont plus pollués que les rivières (70,5 % contre 56,2 %). Ces sites naturels représentent les "réservoirs" potentiels qui, lors de la mousson, après débordement et ruissellement, viennent très probablement contaminer le réseau de distribution.

L'évaluation semi-quantitative nous montre aussi que les échantillons positifs sont peu chargés en oocystes. Dans la majorité des cas, on repère de 3 à 5 oocystes par lame avec des extrêmes allant de 1 à 13 oocystes. Cela bien évidemment est dû au faible volume prélevé au niveau des lacs et des rivières. Cependant, l'existence de ces oocystes, avec une fréquence très élevée au niveau des lacs et des rivières, nous incite à penser que c'est bien à ce niveau que se situe le réservoir de *Cyclospora cayetanensis*.

Concernant la détection en biologie moléculaire de *C. cayetanensis* dans les eaux des lacs et des rivières, nous avons été confrontés à deux problèmes majeurs: d'une part la quantité d'oocystes trop faible au niveau de nos échantillons et d'autre part la très mauvaise qualité de l'eau entraînant très souvent des phénomènes d'inhibition. De très nombreuses techniques

Tableau II.

	Résultats de la répartition des échantillons positifs et négatifs prélevés au sein des 4 districts de Hanoi. Results of repartition of positive and negative samples taken from four districts of Hanoi.											
	Hoan Kiem			Dong Da			Hai Ba Trung			Ba Dinh		
	prélèvements	positifs	total %	positifs	total %	positifs	total %	positifs	total %	positifs	total %	
lacs (68 prélèvements)	4	15	26,6	18	20	90	14	17	82,3	12	16	75
rivières (64 prélèvements)	3	14	21,4	12	18	66,6	11	14	78,5	10	18	55

d'extraction et de purification ont été utilisées, mais, malheureusement, seulement 4 échantillons sur 53 testés ont été trouvés positifs par la technique d'extraction de Sturbaum et de PCR nichée de Relman. Seulement deux de ces échantillons ont été séquencés. Les produits obtenus par PCR ont été comparés avec les séquences publiées dans le Genbank sur le numéro d'accès locus CSU40261 (1747 pb DNA) et locus AF111183 (1795 pb DNA) (5). Le résultat apporte bien la confirmation de l'appartenance à l'espèce *cayetanensis* et recoupe nos observations précédentes dans l'eau de distribution de Hanoï (robinets et réservoirs) (3).

Discussion

Devant nos résultats, nous devons nous interroger sur le très faible pourcentage de prélèvements positifs confirmés par la biologie moléculaire. Il semble se dégager trois hypothèses :

- malgré un œil très exercé de l'observateur en microscopie optique, il reste possible que des organismes morphologiquement identiques ne soient pas des *Cyclospora* ;

- les problèmes d'inhibition semblent représenter une réelle difficulté lorsque l'on réalise les prélèvements dans les eaux d'environnement. Aussi, à l'avenir, il serait souhaitable d'utiliser systématiquement, sur tous les échantillons, un témoin positif d'amplification afin de préciser cette hypothèse et de valider les PCR ;

- enfin, le très faible niveau de contamination des échantillons pourrait être amélioré à condition de passer à des volumes de prélèvements plus importants, afin d'augmenter le nombre d'ocystes. Ceci, bien évidemment, demande une mise en place logistique beaucoup plus importante. Nos observations semblent confirmer ce que ORTEGA (10) a déjà signalé en situant le seuil de détection en biologie moléculaire à plus de 10 ocystes.

Hanoï est une ville située dans une zone tropicale où le climat est doux et humide. Placée à un véritable carrefour fluvial (Song Hong et Son Duong), cette ville se prévaut d'une grande richesse en lacs, fleuves et rivières. Sachant que la très grande majorité de la population s'approvisionne en eau de façon locale, que le système d'évacuation des eaux usées dans certains quartiers est totalement inexistant et que le transport de l'eau traitée se fait par un réseau vétuste, il est aisé de déterminer le rôle prépondérant de l'environnement comme premier réservoir de l'agent pathogène.

Le risque de pollution de l'eau de distribution devient majeur lors de la mousson, avec de multiples débordements des lacs et des rivières accompagnés d'un ruissellement important sur toute la ville.

Actuellement à Hanoï, comme dans de nombreux pays en voie de développement, le rejet des égouts dans le milieu naturel constitue l'origine de la pollution de l'environnement.

Nous avons été particulièrement étonnés d'observer un tel pourcentage (63,6 %) de prélèvements positifs au niveau des lacs et des rivières. Cette eau contaminée est très probablement à l'origine des cas de cyclospore. L'eau de boisson, mais aussi l'ingestion d'aliments contaminés par l'eau d'irrigation,

représentent le risque majeur de contamination. Cette étude confirme également que *Cyclospora* se trouve essentiellement dans des pays aux faibles conditions sanitaires et conforte les observations de STURBAUM (17) au Pérou, qui avait montré la présence de *Cyclospora cayetanensis* dans l'eau de rejet d'un bidonville.

Références bibliographiques

1. ASHFORD RW - Occurrence of an undescribed Coccidian in Man in Papua New Guinea. *Ann Trop Med Parasitol*, 1979, **73**, 495-500.
2. BERLIN OG, NOVAK SM, PORSCHEN RK, LONG EG, STELMA GN & SCHAEFFER FW - Recovery of *Cyclospora* Organisms from patient with prolonged diarrhea. *Clin Infect Dis*, 1994, **18**, 606-609.
3. CAM PD, SOREL N, DAN LC, LARHER E, TASSIN S *et al.* - Contribution à l'épidémiologie de *Cyclospora cayetanensis* à partir d'une étude sur 12 mois réalisée sur l'eau de distribution à Hanoï (Viêt-Nam). *Méd Mal Infect*, 2001, **31**, 591-596.
4. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - Outbreaks of pseudo-infection with *Cyclospora* and *Cryptosporidium*. Florida and New-York City, 1995. *JAMA*, 1997, **277**, 1428-1429.
5. EBERHARD ML, DA SILVA AJ, LILLEY BG & PIENIAZEK NJ - Morphologic and molecular characterization of new *Cyclospora* species from Ethiopian Monkeys: *C. cercopithecii* sp. n., *C. colobi* sp. n. and *C. papionis* sp. n. *Emerg Infect Dis*, 1999, **5**, 651-658.
6. EIMER T - *Veber die ei-und kugelförmigen sogenannten Psoro-spermien der Wirbelthiere (1870)*, pp. 1-58. Würzburg : A. Stuber's Verlagshandlung.
7. HUANG P, WEBER JT, SOSIN DM, GRIFFIN PM, LONG EG *et al.* - The first reported outbreak of diarrhea illness associated with *Cyclospora* in the United States. *Ann Intern Med*, 1995, **123**, 409-414.
8. MIEGEVILLE M & BESSON J - Enquête épidémiologique à partir de neuf cas de cyclospore au retour du Viêt-Nam dans la région nantaise. *BEH*, 1997, **4**, 215.
9. NARANJO J, STERLING CR & GILMAN R - *Cryptosporidium muris-like objects from fecal samples of Peruvians*. Presented at the 38th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Honolulu, Abstract, 1989, Dec, 10-14.
10. ORTEGA YR, ROXAS CR, GILMAN RH, MILLER NJ, CABRERA L *et al.* - Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, **57**, 683-686.
11. RABOLD JG, HOGE CW, SHLIM DR, KEFFORD C, RAJAH R & ECHEVERRIA P - *Cyclospora* outbreak associated with chlorinated drinking water. *Lancet*, 1994, **344**, 1360-1361.
12. RELMAN DA, SCHMIDT TM, GAJADHAR A, SOGIN M, CROSS J *et al.* - Molecular phylogenetic analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggest that it is closely related to *Eimeria* species. *J Infect Dis*, 1996, **173**, 440-445.
13. SANGER F, NIKLEN S & COULSON AR - DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1977, **7**, 5463-5467.
14. SCHNEIDER A - Sur les psorospermies oviformes ou coccidies : espèces nouvelles ou peu connues. *Arch Zool Exp*, 1881, **1**, 387-404.
15. SHLIM DR, COHEN NT, EATEN M, RAJAH R, LONG EG & UNGAR BL - An Alga-like Organism Associated with an Outbreak of Prolonged Diarrhea among Foreigners in Nepal. *Am J Trop Med Hyg*, 1991, **45**, 283-289.
16. SOAVE R, HERWALDT BL & RELMAN DA - *Cyclospora*. *Infect Dis Clin North Am*, 1998, **12**, 1-12.
17. STURBAUM GD, ORTEGA YR, GILMAN RH, STERLING CR, CABRERA L & KLEIN DA - Detection of *Cyclospora cayetanensis* in wastewater. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **6**, 2284-2286.