

ARTICULO ORIGINAL

## Serodiagnóstico de giardiosis: identificación de inmunoglobulina G anti-*Giardia duodenalis* en suero mediante ELISA

Sofía Duque<sup>1</sup>, Rubén Santiago Nicholls<sup>1</sup>, Adriana Arévalo<sup>1</sup>, Rafael Guerrero<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>2</sup> Servicio de Gastroenterología, Hospital Infantil Universitario Lorencita Villegas de Santos; Gastroenterología Pediátrica, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia.

El diagnóstico de la infección por *Giardia duodenalis* se basa en la identificación de quistes o trofozoítos en materia fecal, alcanzando una sensibilidad máxima de 85% en muestras seriadas, debido a la excreción intermitente de quistes. Aunque la determinación de anticuerpos no permite diferenciar entre una infección pasada y una reciente, sí podría ayudar en el diagnóstico diferencial. El presente estudio tuvo como objetivos estandarizar y evaluar una prueba inmunoenzimática (ELISA) para la detección de anticuerpos tipo IgG anti-*Giardia duodenalis* en sueros de pacientes con la infección.

La preparación del antígeno se hizo a partir de trofozoítos cultivados que, inicialmente, fueron obtenidos del intestino de gerbils (*Meriones unguiculatus*) infectados experimentalmente con quistes purificados a partir de muestras positivas de materia fecal humana. Para la estandarización y evaluación de la prueba, se emplearon 60 sueros de pacientes con giardiosis comprobada parasitológicamente (muestras positivas) y 47 sueros de cordón umbilical recién cortado (muestras negativas). Como conjugado, se utilizó anti-IgG humana ligada a fosfatasa alcalina. La concentración óptima de antígeno de trofozoíto de *G. duodenalis* fue de 15 µg/ml y las diluciones óptimas de suero y conjugado fueron 1:25 y 1:400, respectivamente. El valor del punto de corte (absorbancia) fue 0,300. Los parámetros de la prueba fueron: sensibilidad, 98,3% (intervalo de confianza de 95% (IC 95%): 89,9%-99,9%); especificidad, 95,7% (IC 95%: 84,3%-99,3%); valor predictivo positivo, 96,7% (IC 95%: 87,6%-99,4%), y valor predictivo negativo, 97,8% (IC 95%: 87,0%-99,9%).

La prueba ELISA descrita contribuirá a mejorar el diagnóstico de giardiosis y podrá ser empleada para estudios epidemiológicos de seroprevalencia.

**Palabras clave:** *Giardia duodenalis*, inmunodiagnóstico, anticuerpos, ELISA.

**Serodiagnosis of giardiasis: identification of immunoglobulin G anti-*Giardia duodenalis* in sera by ELISA**

Diagnosis of *Giardia duodenalis* infections is based upon identification of cysts or trophozoites in fecal samples. However, sensitivity of parasitological methods reaches a maximum of 85% in multiple samples, due to intermittent excretion of cysts. Presence of antibodies does not distinguish between a recent or a past infection, but they can aid in differential diagnosis. The aim of this study was to standardize and evaluate an immunoenzymatic assay (ELISA) for the detection of anti-*Giardia duodenalis* IgG antibodies in sera from infected patients.

Antigen was prepared from cultured trophozoites initially obtained from the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) that had been previously infected with cysts purified from positive human fecal samples. Sixty sera from patients with parasitologically demonstrated *Giardia* infection (positive samples) and 47 sera from umbilical cords (negative samples) were used to standardize and evaluate the test. Anti human IgG linked to alkaline phosphatase was used as conjugate.

The optimum concentration of *G. duodenalis* trophozoite antigen was 15 µg/ml and the optimum dilutions of sera and conjugate were 1:25 and 1:400, respectively. The cut-off value (absorbance)

was 0.300. The parameters of the test were: sensitivity, 98.3% (95% confidence interval (95% CI): 89.9%-99.9%); specificity, 95.7% (95% CI: 84.3%-99.3%); positive predictive value, 96.7% (95% CI: 87.6% - 99.4%), and negative predictive value: 97.8% (95% CI: 87.0%-99.9%). The ELISA test will improve the diagnosis of giardiasis and will be useful for epidemiological studies of seroprevalence.

**Key words:** *Giardia duodenalis*, immunodiagnosis, antibodies, ELISA.

La giardiosis es la infección por el protozoo flagelado *Giardia duodenalis* cuya distribución es cosmopolita. En Colombia, las prevalencias de giardiosis según las dos encuestas nacionales de morbilidad han sido del 11,9% en la primera, realizada en 1969 (1) y del 13,8% en la segunda, 1980 (2). La prevalencia en niños colombianos entre 1 y 4 años fue de 21,2 y 28% en 1996 (3) y 1998, respectivamente (4).

Tradicionalmente, el diagnóstico de infección por *G. duodenalis* se realiza mediante examen coproparasitológico. Sin embargo, la excreción intermitente de quistes o trofozoítos del parásito hace que no sea posible diagnosticar la infección con *G. duodenalis* en un 10 a 50% de los humanos infectados (5). Por ello, en pacientes con sospecha de giardiosis y en casos de malabsorción sería importante realizar el serodiagnóstico de giardiosis para detectar la presencia de anticuerpos contra el parásito.

Aunque la determinación de anticuerpos no permite diferenciar entre una infección pasada y una reciente, podría ser útil para establecer un diagnóstico diferencial en pacientes con giardiosis sintomática y asintomática. La mayoría de las personas que han estado en contacto con *G. duodenalis* desarrollan anticuerpos contra el parásito los cuales parecen ejercer un papel protector (6).

Los estudios pioneros sobre la respuesta humoral en giardiosis se iniciaron en la década de los setenta cuando se aceptó que *G. duodenalis* es causante de malabsorción intestinal y otras alteraciones gastrointestinales (7). En 1976, se desarrolló una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detección de anticuerpos tipo

IgG. Entre 1978 y 1981, se utilizaron otras metodologías como inmunodifusión (ID), hemoaglutinación (HA) e IFI para detectar todas las inmunoglobulinas (8-10). En la década de los ochenta, se publicaron trabajos sobre la identificación de IgG mediante IFI, ELISA y *Western Blot*, y de IgA e IgM utilizando ELISA (11-16). Entre 1991 y 1993, se recurrió a la prueba de ELISA para la detección de IgM (17, 18) en suero e IgG en eluidos de sangre recolectada sobre papel de filtro (19).

La identificación de anticuerpos contra *G. duodenalis* se ha realizado confrontando muestras de saliva, leche materna, secreciones intestinales y suero de pacientes (20) con antígeno de diferentes estadios del parásito como: a) prequistes (7) con una sensibilidad del 84%, que detecta IgG mediante IFI; b) quistes sonicados (8,13) con sensibilidades del 91 y 99%, que identifica todas las inmunoglobulinas por ID e IgG mediante ELISA; c) trofozoítos (17,18,21) con sensibilidades del 63% al 96%, que identifican IgM mediante ELISA (sensibilidad del 81% al 99%) y detectan IgG por medio de IFI y ELISA (11,12,16,19). El trofozoíto es el estadio que ocasiona la patología en el huésped; de ahí, su utilización desde 1980 como antígeno para la detección de las diferentes inmunoglobulinas en el suero del huésped.

El presente trabajo tuvo como objetivos estandarizar y evaluar en Colombia una prueba inmunoenzimática (ELISA) para la detección de anticuerpos tipo IgG contra *G. duodenalis* utilizando antígeno obtenido a partir de trofozoítos de cepas colombianas.

## Materiales y métodos

### *Obtención de sueros humanos*

Se obtuvieron sueros de 60 pacientes, sintomáticos o no, con giardiosis comprobada parasitológicamente (muestras positivas) mediante

Correspondencia:

S. Duque

sduque@hemagogus.ins.gov.co

Recibido: 07/02/01; aceptado: 06/07/01

examen coproparasitológico en muestras de materia fecal, quienes aceptaron participar en el estudio mediante consentimiento informado. Se definió como paciente sintomático a aquél con enfermedad diarreica con características compatibles con las que se presentan en la giardiosis: diarrea acuosa, abundante, frecuente, espumosa, líquida, con dolor abdominal recurrente, sin pintas de moco ni sangre, y paciente asintomático como aquél sin manifestaciones gastrointestinales. La distribución por edad de los pacientes con giardiosis fue: 1 a 5 años, 34 (56%); 6 a 10 años, 18 (30%); 11 a 15 años, 7 (12%); 16 a 20 años, 1 (2%). Como muestras negativas, se emplearon sueros obtenidos a partir de los cordones umbilicales cortados y desechados de neonatos, cuyas muestras de materia fecal (meconio) fueron negativas para trofozoítos o quistes de *G. duodenalis* en el examen coproparasitológico. En todos los casos, se realizó el examen coproparasitológico mediante examen directo en solución salina fisiológica y lugol (22) y concentración en formol-éter (23). Se analizó sistemáticamente toda el área bajo la laminilla de 22 x 22 mm con aumentos de 100X y 400X.

### **Preparación de antígeno**

Se obtuvieron quistes a partir de muestras fecales humanas, los cuales fueron purificados mediante gradientes de sacarosa y percoll (24-26) y luego inoculados a gerbils (*Meriones unguiculatus*) para obtener trofozoítos a partir de su intestino. Los trofozoítos se cultivaron en medio TYI-S-33-bilis (27). La población de trofozoítos se ajustó a una concentración de  $5 \times 10^6$ /ml, obteniéndose un volumen de 30 ml, y se sometió a un proceso de congelación a  $-196^\circ\text{C}$  (nitrógeno líquido) y descongelación a  $4^\circ\text{C}$  tres veces consecutivas. El producto así obtenido se sometió a disrupción por ultrasonido en un equipo Biosonik II A<sup>R</sup>, *Bronwill Scientific*, Rochester, NY, USA, a una frecuencia de 20 kHz en tres ciclos de 30 segundos cada uno con un 30% de exposición por segundo; se centrifugó y el sobrenadante (antígeno) se recolectó para determinar la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (28).

### **Ensayo inmunoenzimático ELISA**

Se siguieron los lineamientos establecidos por Voller y colaboradores (29), así:

**Estandarización:** se adicionó a cada pozo de la placas de microELISA *Dynatech Immulon I*®, 100 µl de cada una de las siguientes concentraciones de antígeno de trofozoíto de *Giardia*: 0,5, 1, 2,5, 5, 15, 30, 45 y 60 µg/ml, por triplicado y previamente disueltas en solución reguladora de carbonato (0,05M, pH 9,6). Se incubó el antígeno en cámara húmeda durante tres horas y se lavaron las microplacas con PBS 0,15M, pH 7,4 que contenía 0,05% Tween 20 (PBS-T) durante cinco minutos cada vez. Cada pozo de las microplacas se bloqueó con 100 µl de gelatina al 1% y, luego, se procedió a incubar en cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente ( $18^\circ\text{C}$ ). Se lavó como se describió anteriormente. Se adicionaron 100 µl a cada pozo de la microplaca de cada una de las siguientes diluciones: 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200 del suero proveniente de paciente con giardiosis comprobada parasitológicamente (muestra positiva) y de suero de neonato (muestra negativa). Se incubó en cámara húmeda durante dos horas a temperatura ambiente ( $18^\circ\text{C}$ ). Se lavó como se mencionó anteriormente. Se adicionaron 100 µl a cada pozo de las microplacas de cada una de las siguientes diluciones de conjugado (anti-IgG humana unida a fosfatasa alcalina): 1:100, 1:400, 1:800 y 1:1.200. Se incubó en cámara húmeda durante 18 horas a  $4^\circ\text{C}$ . Se lavó como se especificó inicialmente y se adicionaron a cada pozo de las microplacas 100 µl de sustrato, p-nitrofenilfosfato disuelto en solución reguladora de dietanolamina, en una concentración final de 1 mg de sustrato por 1 ml de dietanolamina, respectivamente. Se incubaron las microplacas durante 30 minutos a temperatura ambiente y se detuvo la reacción enzimática adicionando 25 µl a cada pozo de las microplacas con NaOH 3N. Se determinó la presencia de anticuerpos mediante la absorbancia leída por un colorímetro Uniskan I<sup>R</sup> a una longitud de onda de 405 nm.

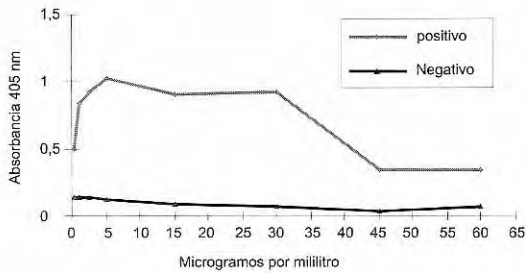
**Discriminación diagnóstica:** el punto de corte, definido como el valor de absorbancia que permitió diferenciar una muestra positiva de una negativa, se estableció sumando el doble de la desviación estándar al promedio de los valores de absorbancia de las muestras negativas (30).

Los parámetros de la prueba inmunoenzimática, sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo

positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) y sus intervalos de confianza del 95%, se determinaron utilizando una tabla de contingencia de 2x2 (31).

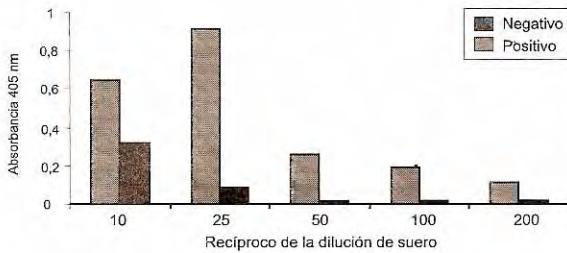
**Resultados**

La concentración óptima de antígeno de trofozoíto de *G. duodenalis* para el inmunoensayo enzimático ELISA, definida como aquella que permitió diferenciar claramente una muestra positiva de una negativa, fue de 15 µg/ml (figura 1). Las diluciones óptimas de suero humano y de conjugado anti-IgG humana, definidas como aquellas que permitieron una mejor diferenciación entre los sueros positivos y los negativos, fueron de 1:25 (figura 2) y 1:400, respectivamente. El valor de absorbancia (punto de corte) fue de 0,300 (figura 3).

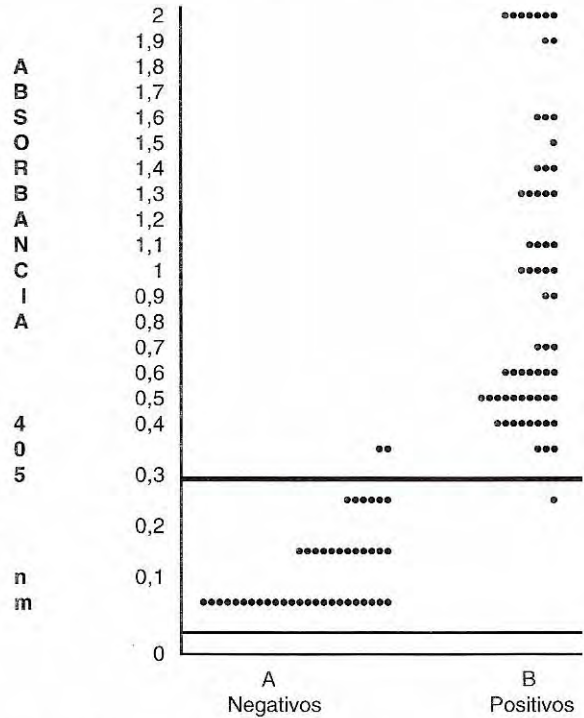


**Figura 1.** Estandarización de la prueba inmunoenzimática ELISA para detección de anticuerpos IgG contra *G. duodenalis*. Determinación de la concentración óptima de antígeno de trofozoíto de *G. duodenalis*.

El primer valor en el eje de las abscisas es 0,5 µg/ml.



**Figura 2.** Estandarización de la prueba inmunoenzimática ELISA para detección de anticuerpos IgG contra *G. duodenalis*. Determinación de la dilución óptima de suero.



**Figura 3.** Inmunodetección de anticuerpos anti-*Giardia duodenalis* por ELISA en 107 muestras de suero. Negativos: 47 sueros de neonato; positivos: 60 sueros de pacientes infectados con *G. duodenalis*.

**Cuadro 1.** Discriminación diagnóstica de la prueba inmunoenzimática ELISA para detección de anticuerpos IgG en giardiosis.

ELISA	Diagnóstico parasitológico		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo DO ≥ 0,300	59	2	61
Negativo DO < 0,299	1	45	46
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>47</b>	<b>107</b>

Los parámetros del ELISA y sus intervalos de confianza del 95% (IC 95%) fueron: S=98% (IC 95%: 89,9%-99,9%); E=96% (IC95%: 84,3%-99,3%); VPP=97% (IC 95%: 87,6%-99,4%), y VPN=98% (IC 95%: 87,0%-99,9%) (cuadro 1).

**Discusión**

Esta prueba ELISA desarrollada en Colombia para el serodiagnóstico de giardiosis utiliza trofozoítos de cepas nativas de *G. duodenalis*, la cual la hace

más apropiada para el país, puesto que las cepas de *G. duodenalis* circulantes en otras regiones geográficas no necesariamente comparten los mismos determinantes antigénicos, pues pueden ocurrir variaciones antigénicas en su superficie tanto *in vivo* como *in vitro* lo cual parece ser inherente a cada cepa. Por tanto, la respuesta humoral puede variar de una región geográfica a otra (32).

Los porcentajes de sensibilidad de la prueba ELISA estandarizada y evaluada por otros investigadores en diferentes regiones del mundo oscilan entre 81 y 92,5% (11,12). Estas variaciones dependen de la concentración y del tipo de antígeno utilizado en los inmunoensayos. Así, cuando se utiliza un volumen de 50 µl de una mezcla de parásitos, sin conocer la concentración de parásitos presentes, la sensibilidad es del 81% (11). Cuando se conoce la concentración de parásitos ( $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$ /ml), pero nuevamente se toma un volumen de 50 µl, la sensibilidad se incrementa al 92,5% (12) y cuando se utilizan trofozoítos con concentración de proteína conocida, 15 µg/ml, como en el presente estudio, se obtuvo una sensibilidad de 98,3%. Esto permite concluir que es necesario conocer con precisión la concentración del antígeno que se utiliza para el desarrollo de una prueba.

Se conoce un estudio (13) en el cual, al utilizar una concentración de proteínas de quistes de *G. duodenalis* de 29,68 µg/ml, la sensibilidad fue del 98,91%. Sin embargo, al utilizarse en el presente trabajo una concentración menor de proteína de trofozoíto del parásito (15 µg/ml), la sensibilidad fue de 98,3%. La utilización de antígeno de trofozoíto a una concentración de proteína conocida hace a la ELISA desarrollada en este estudio, apta para el serodiagnóstico de giardiosis en el país.

Aunque la determinación de anticuerpos no permite diferenciar entre una infección pasada y una reciente, la prueba descrita podría ser útil para estudios clínicos dirigidos a establecer un diagnóstico diferencial o investigaciones de respuesta humoral y para estudios epidemiológicos de seroprevalencia de infección con *G. duodenalis* en la población colombiana.

La alta sensibilidad y especificidad de la prueba permitirán, también, establecer el serodiagnóstico utilizando eluidos de muestras de sangre obtenidas en papel de filtro para su uso en estudios epidemiológicos e inmunológicos, con lo cual se facilitaría el procesamiento de un número grande de muestras a un costo menor del de otras pruebas serológicas, como la inmunofluorescencia indirecta y la inmunodifusión, utilizadas por algunos investigadores (8,9).

La prueba desarrollada podrá ser aplicada en condiciones de campo, pues la presencia de anticuerpos anti-*Giardia* en la población permitirá validar su capacidad para detectar aquellas personas con sintomatología sugestiva de giardiosis que hubiesen estado en contacto con el parásito. Por ser la giardiosis una infección con un amplio espectro de presentaciones, desde formas asintomáticas hasta formas de enfermedad grave, la prueba puede ser importante y valiosa en salud comunitaria al realizar estudios seroepidemiológicos para establecer prevalencias reales en la población adulta e infantil expuesta, siendo estas prevalencias un indicador del grado de contacto de la población con el agente etiológico y, por ende, de las condiciones higiénicas y sanitarias de una comunidad.

## Referencias

1. Galán R, Agualimpia C, Corredor A, Cáceres E. Parasitismo intestinal - Investigación Nacional de Morbilidad. Bogotá, D.E.: Instituto Nacional de Salud; 1969.
2. Corredor A, Arciniegas E, Hernández CA, editores. Parasitismo intestinal. Santa Fe de Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2000.
3. Castro de Navarro L, Nicholls S. Deficiencia de hierro, vitamina A y prevalencia de parasitismo intestinal en la población infantil y anemia nutricional en mujeres en edad fértil, Colombia 1995-96. 1ª edición. Santa Fe de Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 1998.
4. Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. 3ª edición. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB); 1998. p.67.
5. Faubert GM, Belosevic M. Animal models for *Giardia duodenalis* type organisms. En: Meyer EA, editor. Human parasitic diseases. Amsterdam: Elsevier Science Publishers Biomedical Division; 1990. p.77-90.
6. Janoff EN, Smith PD. The role of immunity in *Giardia* infections. En: Meyer EA, editor. Human parasitic dis-

- eases. Amsterdam: Elsevier Science Publishers Biomedical Division; 1990. p.215-33.
7. **Ridley MJ, Ridley DS.** Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis associated with malabsorption. *J Clin Pathol* 1976;29:30-4.
  8. **Vinayak VK, Jain P, Naik SR.** Demonstration of antibodies in giardiasis using the immunodiffusion technique with *Giardia* cysts as antigen. *Ann Trop Med Parasitol* 1978;72:581-2.
  9. **Visvesvara GS, Smith PD, Healy GR, Brown WR.** An immunofluorescence test to detect serum antibodies to *Giardia lamblia*. *Ann Intern Med* 1980;93:802-5.
  10. **Ganguly NK, Mahajan RC, Vasudev V, Radha Krishna, Anand BS, Dilawari JB, et al.** Comparative evaluation of indirect haemagglutination and immunofluorescence tests in serodiagnosis of giardiasis. *Indian J Med Res* 1981;73(Suppl.1):111-3.
  11. **Smith PD, Gillin FD, Brown WR, Nash TE.** IgG antibody to *Giardia lamblia* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Gastroenterology* 1981;80:1476-80.
  12. **Wittner M, Maayan Sh, Farrer W, Tanowitz HB.** Diagnosis of giardiasis by two methods. *Arch Pathol Lab Med* 1983;107:524-7.
  13. **Haralabidis STh.** Immunodiagnosis of giardiasis by ELISA and studies on cross-reactivity between the anti-*Giardia lamblia* antibodies and some heterologous parasitic antigens and fractions. *Ann Trop Med Parasitol* 1984; 78:295-300.
  14. **Goka AKJ, Rolston DDK, Mathan VI, Farthing MJG.** Human serum IgA response to *Giardia lamblia*. *Gut* 1987; 28:A1351.
  15. **Taylor GD, Wenman WM.** Human immune response to *Giardia lamblia* infection. *J Infect Dis* 1987;155:137-40.
  16. **Rojas L, Torres D, Mediola B, Finlay C.** Detection of specific anti-*Giardia* serum antibody by an immunofluorescence test in children with clinical giardiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:477-9.
  17. **Sullivan PB, Neale G, Cevallos AM, Farthing MJG.** Evaluation of specific serum anti-*Giardia* IgM antibody response in diagnosis of giardiasis in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85:748-9.
  18. **Al-Tuki MH, Ackers JP, Al-Ahdal MN, Taha MA, Peters W.** ELISA for detection of anti-*Giardia* specific IgM: response in serum. *J Trop Med Hyg* 1993;96:333-6.
  19. **Al-Tuki MH, Ackers JP, Al-Ahdal MN, Peters W.** Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of anti-*Giardia* specific immunoglobulin G in filter paper blood samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87:36-8.
  20. **Engelkirk PG, Pickering LK.** Detection of *Giardia* by immunologic methods. En: Meyer EA, editor. *Human parasitic diseases*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers Biomedical Division; 1990. p.187-98.
  21. **Goka AKJ, Rolston DDK, Mathan VI, Farthing MJG.** Diagnosis of giardiasis by specific IgM antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet* 1986;ii:184-6.
  22. **Bailey W.** Laboratory diagnosis of parasitic disease. En: Manson-Bahr PEC, Bell DR, editors. *Manson's tropical diseases*. 19th edition. London: Baillière Tindall; 1987. p.1490.
  23. **Ridley DS, Hawgood BC.** The value of formol-ether concentration of faecal cysts and ova. *J Clin Pathol* 1956; 9:74-6.
  24. **Sauch JF.** Purification of *Giardia lamblia* cysts velocity sedimentation. *Appl Environ Microbiol* 1984;48:454-5.
  25. **Roberts-Thomson IC, Stevens DP, Mahmoud AAF, Warren KS.** Giardiasis in the mouse: an animal model. *Gastroenterology* 1976;71:57-61.
  26. **Arévalo A.** Detección de antígeno de *Giardia* en materia fecal de *Meriones unguiculatus* (gerbil) por ELISA utilizando anticuerpos policlonales (tesis). Santafé de Bogotá, D.C.: Pontificia Universidad Javeriana; 1999.
  27. **Keister DB.** Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI S-33 medium supplemented with bile. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1983;77:487-8.
  28. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
  29. **Voller A, Bidwell DE, Bartlett A.** Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull WHO* 1976;53:55-65.
  30. **Kurstak E.** Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. *Bull WHO* 1985;63:793-811.
  31. **Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AI, Greenland P.** Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. *Ann Intern Med* 1981;94:559-63.
  32. **Nash T.** Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. *Parasitol Today* 1992;8:229-34.