

Veterinaria México

Volumen
Volume 33

Número
Number 1

Enero-Marzo
January-March 2002

Artículo:

Evaluación de la capacidad
inmunogénica de la vacuna *Giardia-*
vax, utilizando un modelo
experimental de giardiasis en gerbos
(*Meriones unguiculatus*)

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

Evaluación de la capacidad inmunogénica de la vacuna *Giardia-vax*, utilizando un modelo experimental de giardiasis en gerbos (*Meriones unguiculatus*)

Immunogenic evaluation of the *Giardia-vax* vaccine's activity using an experimental model of giardiasis in gerbils (*Meriones unguiculatus*)

Enedina Jiménez-Cardoso*
Leticia Eligio-García*
Adrián Cortés-Campos*

Abstract

Evaluation of the prophylactic activity of a vaccine *Giardia-vax* against experimental infection on *Meriones unguiculatus* (gerbils) challenges with *Giardia intestinalis* trophozoites, was tested. Forty five animals with a body weight of 16.0 ± 0.5 g were used and divided in three Groups: *a*) the control, without inoculation; *b*) the positive control, infected via gastric with 1×10^7 trophozoites from Portland-I type *Giardia intestinalis*; and *c*) the vaccinated group, which received two doses of 1mL of *Giardia* vaccine with an interval of a week between both doses. Thereafter, animals were infected with 1×10^7 *Giardia* trophozoites. A coproparasitoscopic (CPS) analysis was carried out every third day for 15 days after the infection. A serum antibody test (ELISA) against *Giardia* was performed before- and after the vaccination or the infection. Group *a*) did not eliminate *Giardia* when CPS analysis was performed; Group *b*) showed elimination of *Giardia* all the time; and in Group *c*), 5/15 animals had negative CPS from the third day on after the infection until the end of the study, and the other 10/15 animals showed positive CPS until the seventh day; and after this, all CPS were negative. Groups *b*) and *c*) had serum antibodies that statistically had a $P < 0.05$ before- and after infection. Levels of antibodies were higher in Group *c*) and in five of them. No colonization was observed to trophozoites. These results suggest that the vaccine was able to stimulate antibodies to *Giardia* protecting animals against future infections.

Key words: GIARDIASIS, GERBILS, *MERIONES UNGUICULATUS*, ZOONOSIS, VACCINATION.

Resumen

Se evaluó la efectividad profiláctica de la vacuna *Giardia-vax* a la infección experimental en *Meriones unguiculatus* (gerbos) desafiados con trofozoitos de *Giardia intestinalis*. Se utilizaron 45 animales con un peso de $16.0 \text{ g} \pm 0.5$ g, distribuidos aleatoriamente en tres grupos de 15 animales: *a*) Grupo testigo negativo, sin infectar; *b*) testigo positivo, infectado por vía gástrica con 1×10^7 trofozoitos de *Giardia intestinalis* cepa Portland-I; y *c*) el grupo vacunado con dos dosis de 1 ml con diferencia de una semana y posteriormente infectados con 1×10^7 trofozoitos de *Giardia*. A los tres grupos se les realizó análisis coproparasitoscópico (CPS) cada tercer día, durante 15 días, así como el nivel de anticuerpos del suero por ELISA antes y después de la infección o vacunación. El grupo testigo positivo eliminó quistes de *Giardia* en heces durante todo el experimento. En el grupo vacunado 5/15

Recibido el 16 de agosto de 2001 y aceptado el 19 de septiembre de 2001.

* Laboratorio de Investigación en Parasitología, Hospital Infantil de México, Dr. Márquez 162, Col. Doctores, 06720, México, D. F. E-mail: enedina@servidor.unam.mx Tel/fax: 5588-4019.

animales presentaron CPS negativo al tercer día posinfección y se mantuvieron hasta el final del estudio. Los animales restantes 10/15 fueron positivos hasta el séptimo día, después el resultado fue negativo, y permaneció así hasta el final del estudio. En los grupos primero y tercero, el nivel de anticuerpos presentó valor $P < 0.05$ antes y después de la infección. En el grupo c se observó el nivel de anticuerpos séricos más alto y en 5/15 animales no se permitió la colonización de los trofozoitos. Los resultados sugieren que la vacuna estimula la producción de anticuerpos anti-*Giardia*, protegiendo a los animales de infecciones posteriores.

Palabras clave: GIARDIASIS, GERBOS, *MERIONES UNGUICULATUS*, ZOONOSIS, VACUNACIÓN.

Introduction

Despite of the technological and scientific progress achieved in the area of health, *Giardia intestinalis* is the bowel parasite that most frequently causes diarrhea throughout the world, and specially among children.¹⁻³ The infectious carrier is contaminated water with viable cysts or directly from person to person.⁴ The infection may be non symptomatic, or present with some occasional upset. When symptoms are present, these may be featured as diarrhea, intestinal disorders, flatulence and abdominal distention.^{5,6} This problem can be spontaneously solved, or it may develop into a chronic disease with alternated diarrheic periods and abdominal upset where injury is reflected by a lack of intestinal absorption. In children, the consequence is an alteration in their growth and development.⁷⁻⁸

Some domestic and wild animals play an important role in the transmission of giardiasis,⁹⁻¹¹ as these may be infected with *Giardia*, and release a great amount of potentially infecting cysts in the environment. These may easily be disseminated and contaminate water and food for human consumption. It is therefore, very important to control infection in domestic animals and eliminate one of the main infectious sources.

An experimental form of systematic immunization with a 56kDa *Giardia* immune dominant protein has been tested to demonstrate a successful protection against this parasitosis.¹² At the same time, a vaccine has been tested in dogs^{13,14} with efficient results.

The purpose of this work was to evaluate the prophylactic efficiency of the *Giardia*-vax* vaccine against the experimentally developed infection in *Meriones unguiculatus* with viable trophozoites of *Giardia intestinalis*, using the lack of protozoa cysts in feces as efficient parameters, and the level of anti-*Giardia* antibodies in serum.

Material and methods

Forty-five recently weaned gerbils (*Meriones unguiculatus*) aged 21 days obtained from the Hospital Infantil

Introducción

A pesar de los avances tecnológicos y científicos en materia de salud, *Giardia intestinalis* sigue siendo el parásito intestinal más frecuente como causa de diarrea en todo el mundo, especialmente entre la población infantil.¹⁻³ La vía de infección es a través de agua contaminada con quistes viables o bien en forma directa de persona a persona.⁴ La infección puede ser asintomática y sólo presentar trastornos ocasionales transitorios, o sintomática caracterizada por diarrea, vómito, sensación de malestar intestinal, flatulencia y distensión abdominal.^{5,6} Este cuadro puede resolverse de manera espontánea o progresar a una enfermedad crónica con alternancia de periodos de diarrea y malestar abdominal, en donde el daño que se produce se ve reflejado por una falta de absorción intestinal y, como consecuencia, en los niños una alteración en su crecimiento y desarrollo.^{7,8}

Otro factor importante en la transmisión de la giardiasis es el papel de portador que desempeñan algunos animales domésticos y silvestres⁹⁻¹¹ que pueden estar infectados con *Giardia* y liberar gran cantidad de quistes potencialmente infectantes en el ambiente; éstos fácilmente pueden diseminarse y contaminar el agua, así como alimentos de consumo humano; en este sentido, es de gran importancia controlar la infección en animales domésticos y con ello eliminar una de las principales fuentes de infección.

Con el propósito de demostrar que se puede proteger contra esta parasitosis, se ha utilizado en forma experimental la inmunización sistemática con una proteína inmunodominante de 56 kDa de *Giardia* con buenos resultados,¹² igualmente se ha utilizado una vacuna en forma experimental en perros,^{13,14} demostrándose su efectividad en estos animales.

El propósito de este trabajo fue evaluar la efectividad profiláctica de la vacuna *Giardia*-vax* a la infección desarrollada experimentalmente en *Meriones unguiculatus* con trofozoitos viables de *Giardia intestinalis*, utilizando como parámetros de eficacia la ausencia de

* Fort Dodge Laboratories Inc. Iowa, 50501, USA.

de México (Mexican Infants Hospital) were used. A stool sample was obtained from each animal for coproscopic studies in a series of three to verify the absence of parasites in feces.¹⁵ An evaluation of the level of anti-*Giardia* antibodies in serum using the ELISA technique¹⁶ was also undertaken using as an antigen 100 µg of the total extract of *Giardia intestinalis*, Portland-I strain, axenically cultured in a TY1-S-33¹⁷ medium. The plate was incubated with the first antibody (sera) 1:100 in 5% PBS-milk; the second antibody was an anti-IgG of mouse conjugated in peroxidase in a 1:4000 dilution. The plate was developed with H₂O₂ and o-fenilendiamine to develop the color and define its optic density at $\lambda = 450$ nm. Sera from 40 recently weaned gerbils was obtained in order to define the cohort point considering the $DO \pm 2$ standard deviation average.

Through the SPSS¹⁸ program, animals were randomly distributed in three groups of 15 individuals with an average weight of 16.0 ± 5.0 g each. The first two groups were used as negative and positive witnesses, and the latter was orally infected with a suspension made up with 1×10^7 *Giardia intestinalis* Portland-1 strain trophozoites cultured in the same way as mentioned before. Animals of the vaccinated group received an intramuscular injection dose of *Giardia-vax* in one of the lower extremities, and the second dose was administered a week later. Animals were orally infected with an axenically cultured suspension prepared with $1 \times 10^7/0.1$ ml *Giardia intestinalis* Portland-1 strain trophozoites seven days after the last vaccination.

Stool samples were taken every third day from animals of the three groups (negative and positive witnesses, and vaccinated ones) in order to verify the presence of *Giardia intestinalis* cysts. Blood samples were taken through cardiac puncture after thirty days from animals of the three groups in order to confirm the presence of anti-*Giardia* antibodies in serum through the ELISA technique.

The arithmetic average (\bar{X}) and standard deviation (STD) were defined with DO values obtained from the level of antibodies in the previous and final experiment's sera, and statistically significant differences were established when the value was of $P < 0.05$ using Student's "t".¹⁸

Results

Stool sample results in animals from the negative witness group were negative during all the experimental stage. The elimination of *Giardia* cysts in feces was observed in the positive witness group during the experiment, and stool samples were positive in all animals on the last day. With respect to the vaccinated

quistes del protozoario en heces y el nivel de anticuerpos anti-*Giardia* en el suero.

Material y métodos

Se utilizaron 45 gerbos (*Meriones unguiculatus*), recién destetados, de 21 días de edad, obtenidos del Bioterio del Hospital Infantil de México. A todos los animales se les practicó coproparasitoscópico en serie de tres para asegurar la ausencia de parásitos en heces,¹⁵ así como el nivel de anticuerpos anti-*Giardia* en suero utilizando la técnica de ELISA,¹⁶ como antígeno se usaron 100 µg/pozo de extracto total de *Giardia intestinalis* cepa Portland-I, cultivada axénicamente en medio TY1-S-33,¹⁷ La placa se incubó con el primer anticuerpo (sueros) 1:100 en PBS-leche al 5%, el segundo anticuerpo fue un anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa en una dilución 1:4 000, el revelado se llevó a cabo con H₂O₂ y o-fenilendiamina para desarrollar el color y determinar la densidad óptica a $\lambda = 450$ nm. Se utilizaron sueros de 40 gerbos recién destetados con el propósito de determinar el punto de cohorte, considerando el promedio de $DO \pm 2$ desviaciones estándar.

Mediante el programa SPSS,¹⁸ los animales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos de 15 individuos cada uno, con un peso promedio de 16.0 ± 5.0 g. Los primeros dos grupos sirvieron como testigos negativo y positivo, respectivamente; a este último se le infectó por vía oral una suspensión 1×10^7 trofozoítos de *Giardia intestinalis* cepa Portland-I, cultivada en la forma ya mencionada. A los animales del grupo vacunado se les administró una dosis de la vacuna *Giardia-vax* por vía intramuscular, en una de las extremidades inferiores; y la segunda dosis, una semana después. Siete días posteriores a la última vacuna, se les infectó por vía oral una suspensión de $1 \times 10^7/0.1$ ml de trofozoítos de *Giardia intestinalis* cepa Portland-I, cultivada axénicamente.

A los animales de los tres grupos (testigos negativo y positivo, y vacunado) se les practicó cada tercer día análisis coproparasitoscópico para determinar la presencia de quistes de *Giardia intestinalis*, después de 30 días a los animales de los tres grupos, se les tomó sangre por punción cardiaca para determinar la presencia de anticuerpos anti-*Giardia* en suero mediante la técnica de ELISA.

Con los valores de DO obtenida del nivel de anticuerpos en el suero previo y final del experimento, se determinó en los tres grupos el promedio aritmético (\bar{X}) y la desviación estándar (DST) y se estableció si había diferencias estadísticamente significativas cuando el valor fue de $P < 0.05$ utilizando la "t" de Student.¹⁸

Resultados

En los animales del grupo testigo negativo, los resultados coproparasitoscópicos fueron negativos durante

experimental group, following the challenge, 5/15 animals were negative since the first stool test, and remained likewise until the end of the experiment. In the 10/15 remaining animals, the stool test was positive to *Giardia* post-infection, and it was negative on the seventh day, remaining like this in all animals until the end of the experiment (Figure 1).

The cohort point obtained with serum of normal animals was $DO \pm 2 \bar{X} = 0.0897 \pm 2 (0.0215) = 0.1327$. With respect to the level of antibodies in the positive witness group, DO value was $\bar{X} = 0.1171 \pm 0.0120$, and 15 days after the challenge of $\bar{X} = 0.2162 \pm 0.0445$. These results showed statistically significant differences ($P \leq 0.05$). The same thing happened with the vaccinated group in which initial DO values were $\bar{X} = 0.1145 \pm 0.0337$, and at the end of vaccination and challenge they were $DO \bar{X} = 0.4621 \pm 0.0350$ with a value of $P < 0.05$. With respect to the negative witness group, initial and final DO values did not present statistically significant differences as it is shown in Table 1.

Discussion

The vaccine's protective activity shown in this study evidenced its prophylactic quality, as it hindered the colonization of *Giardia* trophozoites in the bowel of five of the vaccinated animals. It is consequently assumed that the protective effect was due to the development of the humoral capacity in vaccinated

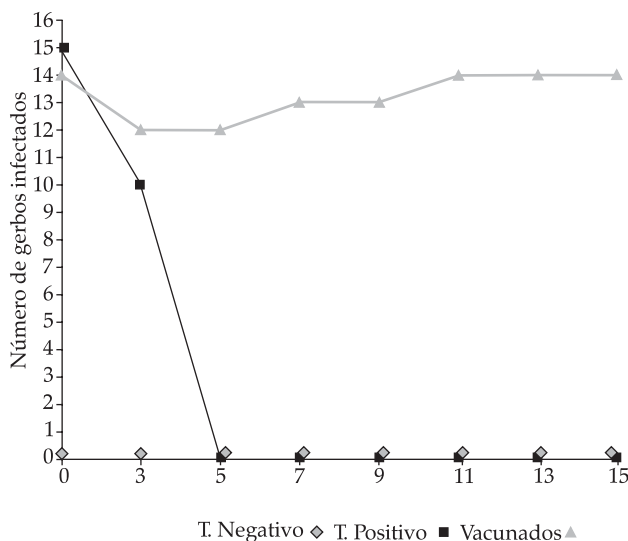


Figura 1. Resultado del análisis coproparasitoscópico (3) de material fecal de gerbos sin infectar, infectados y vacunados, posterior a la infección con *Giardia intestinalis*.

Coproparasitoscopic analyses (3) of gerbil's faeces; infected, not infected and vaccinated after infection with *Giardia intestinalis*.

todo el tiempo de experimentación. En el grupo testigo positivo se observó la eliminación de quistes de *Giardia* en heces en el curso del experimento, así como en el último día el coproparasitoscópico fue positivo en todos los animales. Con relación al grupo experimental vacunado, posterior al desafío, 5/15 animales fueron negativos desde el primer examen coproparasitoscópico y se mantuvieron así hasta el final del experimento. En los 10/15 animales restantes, el coproparasitoscópico fue positivo a *Giardia* posinfección y en el séptimo día fue negativo, manteniéndose así hasta el final del experimento en todos los animales (Figura 1).

El punto de cohorte obtenido con el suero de los animales normales fue de $DO \pm 2 \bar{X} = 0.0897 \pm 2 (0.0215) = 0.1327$. Con relación al nivel de anticuerpos en el grupo testigo positivo, el valor de DO fue $\bar{X} = 0.1171 \pm 0.0120$ y 15 días después del desafío de $\bar{X} = 0.2162 \pm 0.0445$. Estos resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$). Algo similar sucedió con el grupo vacunado, cuyos valores iniciales de DO fueron de $\bar{X} = 0.1145 \pm 0.0337$ y al finalizar la vacunación y desafío de $DO \bar{X} = 0.4621 \pm 0.0350$, con un valor de $P < 0.05$. Respecto del grupo testigo negativo, los valores de DO inicial y final no presentaron diferencias estadísticamente significativas, como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1

VALORES PROMEDIO DE LA DO OBTENIDA EN SUERO POR LA TÉCNICA DE ELISA EN ANIMALES TESTIGO NEGATIVO, POSITIVO Y VACUNADOS ANTES Y DESPUÉS DEL DESAFÍO CON 1×10^7 TROFOZOITOS DE *Giardia*.

AVERAGE OF VALUES OF OD IN SERUM BY ELISA POSITIVE, NEGATIVE, CONTROL AND VACCINATED ANIMALS BEFORE AND AFTER THE CHALLENGE WITH 1×10^7 TROPHOZOITES OF *Giardia*.

Testigo negativo Negative control	Testigo positivo Positive control	Vacunados Vaccinated
Densidad óptica ($\lambda = 450$ nm) Optical density ($\lambda = 450$ nm)		
*0.0897 \pm 0.009	**0.1171 \pm 0.0120	***0.1145 \pm 0.0337
+0.0890 \pm 0.01	++0.02162 \pm 0.044	+++0.4621 \pm 0.0350

* Before vs + After ($P \geq 0.005$)

** Before vs ++ After ($P \leq 0.005$)

*** Before vs +++ After ($P \leq 0.005$)

animals. The presence of *Giardia* antigens demonstrated by specific antibodies formed during the 15 days of vaccination, prevented the presence of *Giardia* cysts in feces of the remaining animals (10/15) after seven days.

It is important to highlight that the levels of anti-*Giardia* antibodies in animals infected with *Giardia* (positive witnesses), whilst these remained infected during two weeks, were not increased in the same way as in vaccinated animals. This is the reason that explains the ongoing infection; probably the antigenic discharge during the challenge was not sufficient.

The participation of antibodies has been demonstrated in vaccinated animals, where these have a cytolytic effect on cysts or inactivation of trophozoites during the cyst's removing process.^{13,19} Oral or systemic vaccinations with the corresponding development of humoral immunity are crucial due to their efficacy as both produce important quantities of IgA and IgG to eliminate the parasite. It has been observed that immunization where the parasite participates is more effective than using cyto-skeleton proteins and even membrane antigens.²⁰ An explanation for this, is that the production of these antibodies may induce antigens with specific variability, and be replaced with new antigens.²¹

Perspectives for the utilization of an anti-*Giardia* vaccine are important as these may prevent cysts' dissemination in humans and animals preventing water and food contamination, and this parasitism in children which affects their growth and development.

Variability in the prevalence of this parasitism is probably explained by the zoonotic transmission,²² therefore, vaccination in animals may prevent intra-species transmission. From the epidemiological point of view, another advantage of vaccination could be its utilization in endemic regions where poor sanitary conditions prevail, and avoid its pathogenic effect on intestinal mucous, and the one produced by its toxins, such as hypersensitivity, food allergy²³ sinovitis,²⁴ and arthritis²⁵ including resistance to drugs, such as benzimidazole and metronidazole.

Although it is true that the vaccine has been fully tested in the USA, there is no precedent in Mexico of a similar product. It was, therefore, necessary to create an efficient parameter to verify and evaluate the efficacy of this product and similar ones in this country.

This study helps to impel the bases to develop new experimental models in the utilization of such product for the control of giardiasis in various domestic species. It is important to underline that giardiasis is a widely spread parasitic problem that impacts the environment where human participation is accountable. Collective immunization techniques must be implemented to decrease the clinical incidence and serious-

Discusión

La actividad protectora de la vacuna demostrada en este estudio, puso en evidencia su cualidad profiláctica, ya que en cinco de los animales vacunados, se impidió la colonización del intestino por trofozoitos de *Giardia*. Se infiere, en consecuencia, que el efecto protector fue consecuencia del desarrollo de la capacidad humoral en los animales vacunados, la presencia de antígenos de *Giardia*, demostrada por anticuerpos específicos formados durante los 15 días que duró la vacunación, permitió al resto de los animales (10/15) que después de siete días ya no se observaron quistes de *Giardia* en las heces de estos animales.

Es importante destacar que los niveles de anticuerpos anti-*Giardia* en los animales infectados con *Giardia* (testigos positivos), a pesar de mantenerse infectados durante quince días, no se elevaron en la misma forma que los animales vacunados, lo cual explica el porqué continuaron con la infección; probablemente la descarga antigénica durante el desafío no fue suficiente.

La participación de los anticuerpos ha sido demostrada en animales vacunados, donde éstos tienen un efecto citolítico sobre los quistes o inactivación de los trofozoitos durante el proceso de desenquistamiento.^{13,19} Las vacunas administradas por vía oral o sistémica, con el consecuente desarrollo de la inmunidad humoral, es crucial para su eficacia, ya que en ambas se produce IgA e IgG en cantidades suficientes para eliminar al parásito. Se ha observado que en la inmunización donde participa el parásito, es más efectiva que si se utilizan proteínas del citoesqueleto, e incluso antígenos membranales.²⁰ La explicación es que la producción de estos anticuerpos pueden inducir antígenos con variabilidad específica y remplazarse por nuevos antígenos.²¹

Las perspectivas del empleo de una vacuna anti-*Giardia* son importantes porque puede prevenir la diseminación de quistes en humanos y animales, evitando la contaminación del agua y de los alimentos, trayendo un efecto benéfico muy importante al limitar esta parasitosis en los niños, donde, como ya se mencionó, afecta su crecimiento y desarrollo.

La variabilidad en la prevalencia de esta parasitosis, probablemente se explique por la transmisión zoonótica,²² de tal manera que la vacunación en animales podría prevenir la transmisión intraespecies.

Otra ventaja importante de la vacunación es desde el punto de vista epidemiológico, ya que podría utilizarse en regiones endémicas donde hay malas condiciones sanitaria, así como evitar el efecto patogénico de ésta, no sólo a nivel de la mucosa intestinal, sino también del efecto producido por sus toxinas, tales como reacciones de hipersensibilidad, alergia a los alimentos,²³ sinovitis,²⁴ y artritis,²⁵ incluyendo la resistencia a fármacos como son los benzimidazoles y metronidazoles.

ness of this disease, and tackle the economic loss caused by the gastro-enteric injury result of *Giardia's* pathologic process.

Referencias References

1. Adam RD. The biology of *Giardia* spp. Microbiol Rev 1991;55:706-32.
2. WHO (1996). The world health report. Washington (DC): World Health Organization, 1996.
3. Hermida RC, Ayala DE, Arroyave RJ. Circannual incidence of *Giardia lamblia* in Mexico. Chronobiol Int 1990;7:329-40.
4. Hill DR. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. Infect Dis Clin North Am 1993;7:503-525.
5. Lewis DJ, Freedman AR. *Giardia lamblia* as an intestinal pathogen. Dig Dis 1992;10:102-111.
6. Farthing MJ. Giardiasis. Gastroenterol Clin North Am 1996;25:493-515.
7. Erlandsen SL, Chase DG. Morphological alterations in the microvillous border of villous epithelial cells produced by intestinal microorganisms. Am J Clin Nutr 1974;27:1277-1286.
8. Savidge TC, Shmakov AN, Walker-Smith JA, Phillips AD. Epithelial cell proliferation in childhood enteropathies. Guts 1996;39:185-193.
9. Hill SL, Cheney JM, Taton-Allen GF, Reif JS, Bruns C, Lappin MR. Prevalence of enteric zoonotic organisms in cats. J Am Vet Med Assoc 2000;216:687-692.
10. Barr SC, Bowman DD. Giardiasis in dogs and cats. Comp Cont Educ Pract Vet 1994;16:603-614.
11. Marshall MM, Naumovits D, Ortega Y, Sterling CR. Waterborne protozoan pathogens. Clin Microbiol Rev 1997;10:67-85.
12. Vinayak, VK, Kum Khanna R, Khuller M. Systemic-oral immunization with 56 kDa molecule of *Giardia lamblia* affords protection in experimental mice. Vaccine 1992;10:21-27.
13. Olson ME, Morck DW, Ceri H. Preliminary data on the efficacy of a *Giardia* vaccine in puppies. Can Vet J 1997;38:777-779.
14. Olson ME, Ceri H, Morck DW. *Giardia* vaccination. Parasitol Today 2000;16:213-217.
15. Faust EC, D'Santoni JS. A clinical study of laboratory techniques for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in faeces. Am J Trop Med 1938;18:169-183.
16. Yanke, SJ, Ceri H, McAllister TA, Morck DW, Olson ME. Serum immune response to *Giardia* in experimentally infected lambs. Vet Parasitol 1998;75:9-19.
17. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983;77:487-488.
18. INSO corporation. SPSS® base 10.0. Applications guide. Chicago (IL): SPSS Inc., 1999.
19. Chaudhuri PP, Das D, Sarkar S, Munoz ML, Das P. Biochemical and immunological characterization of soluble antigens of *Giardia lamblia*. Parasitol Res 1997;83:604-610.
20. Olson ME. *Giardia* vaccine. United States Patent 554:9899. Calgary, Canada: United States Patent Office, 1996.
21. Buret A. Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. Parasitol Today 1992;8:229-234.
22. Faubert GM. Evidence that giardiasis is a zoonosis. Parasitol Today 1998;4:66-71.
23. Di Prisco MC, Hagel L, Lynch NR, Jimenez JC, Rojas R, Gil M, Mata E. Association between giardiasis and allergy. Ann Allergy Asthma Immunol 1998;81:261-265.
24. Letts M, Davidson D, Lalonde F. Synovitis secondary to giardiasis in children. Am J Orthop 1998;27:451-454.
25. Shaw RA, Stevens MB. The reactive arthritis of giardiasis, a case report. J Am Med Assoc 1987;258:2734-2735.