

**Ricerca Corrente IZS SA 02/05**

**Relazione finale**

**Utilizzo di una proteina ricombinante di  
*Echinococcus granulosus* a scopo vaccinale**

**Responsabile: Dott.ssa Sebastiana Tola**

*Gli obiettivi indicati nel progetto erano i seguenti:*

- **Purificazione della proteina di fusione**
- **Vaccinazione di un campione di pecore**
- **Controllo della risposta immunitaria**

## ***Premessa***

L'Echinococcosi rappresenta un importante problema di sanità pubblica in numerose aree del mondo e assume, fra l'altro, particolare rilevanza nel bacino del Mediterraneo, dove è considerata una delle principali parassitosi degli animali in produzione zootecnica e riveste un notevole significato sociale per l'alta diffusione nell'uomo (Eckert et al., 2004). L'Echinococcosi continua ad imperversare infatti in quelle regioni geografiche in cui il binomio ovino-cane è ancora ben rappresentato. E' infatti ormai ampiamente assodato che, seppure la parassitosi possa coinvolgere varie specie animali (uomo compreso), sia soprattutto la stretta convivenza tra queste due specie (ovino e cane) il fattore più importante per la persistenza in alcuni distretti geografici colpiti da questa infestazione. Tutto questo si perpetua ormai da tempo immemorabile, nonostante nei suoi confronti si siano spesso concentrati gli sforzi di varie categorie (veterinari, medici, politici) per cercare di arginare una parassitosi che varie cause (sociali, economiche e politiche), hanno reso il suo controllo od eradicazione non sempre possibile. E' il caso ad esempio della Sardegna, in cui l'Echinococcosi/Idatidosi costituisce ancora oggi un problema per l'uomo. Infatti, la Sardegna, con circa 110 nuovi casi di echinococcosi cistica/anno, è considerata una regione iperendemica. Per tale motivo è stato istituito presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, in data 08 Maggio 2002, con decreto del Ministero della Salute, il Centro Nazionale di Referenza per l'Echinococcosi/Idatidosi (CeNRE).

Un approccio differente alla problematica Echinococcosi è emerso nel Congresso Internazionale di Idatidologia tenutosi nel 1999 in Argentina. La nuova frontiera per il controllo sembra essere l'applicazione delle tecniche biomolecolari finalizzate alla realizzazione di un vaccino ricombinante contro *E. granulosus*. In tale congresso sono stati infatti presentati i risultati positivi ottenuti in Nuova Zelanda, Australia e Argentina con l'utilizzo di un vaccino costituito esclusivamente da una proteina ricombinante codificata da un gene del parassita (Lightowlers et al., 1999). A tale gene un team di ricercatori è pervenuto dopo aver osservato che l'immunità acquisita dalle pecore in seguito a infestazioni con *E. granulosus* è determinata da antigeni presenti nelle oncosfere (Heath & Lawrence, 1976). In particolare, essi hanno dimostrato che l'utilizzo di un estratto di oncosfere, se preparato in modo da preservare l'integrità delle

proteine, conteneva un immunogeno dominante. Dopo numerosi tentativi atti a frazionare e purificare le proteine delle oncosfere in modo da identificare le molecole protettive, i ricercatori dimostrarono che una molecola, che in SDS-PAGE correva come un doppietto di 23 e 25 kDa, risultava fortemente immunogenica (Heath & Lawrence, 1996). Perciò realizzarono una libreria di cDNA a partire dagli RNA messaggeri delle oncosfere. Tale libreria fu “screenata” con anticorpi purificati per affinità anti-23-25 kDa. Successivamente selezionarono un certo numero di cloni contenenti gli inserti di DNA dell'*Echinococcus granulosus*. Tali inserti furono trasferiti in un sistema di espressione pGEX allo scopo di produrre proteine ricombinanti (Smith & Johnson, 1988). Un clone, denominato Eg95, produceva una proteina ricombinante che, inoculata in pecore, induceva una protezione stimata intorno al 98% (Lightowers et al., 1996; Lightowers et al., 1999) . Da allora questa proteina ricombinante è stata utilizzata a differenti concentrazioni e con differenti adiuvanti (Craig, 1997; Carol & Nieto 1998). Di tale clone, naturalmente, è conosciuta anche la sequenza nucleotidica, riportata in banca dati e disponibile on-line.

Col presente lavoro si intende descrivere: 1) la purificazione della proteina ricombinante 2) la vaccinazione di un campione di pecore 3) il controllo della risposta immunitaria.

## ***Materiali e metodi***

Per questo lavoro, abbiamo raccolto organi infestati di ovini di razza *sarda* regolarmente macellati in diversi mattatoi delle Province di Sassari e di Nuoro. Dalle cisti, dopo l'aspirazione del liquido cistico, sono state prelevate le membrane prolifere e i protoscolici (Figure 1 e 2).



**Figura 1** - Prelievo del liquido cistico da un polmone fortemente infestato



**Figura 2** - Prelievo della membrana prolifera da una cisti polmonare

Di questi ultimi è stata valutata la vitalità attraverso l'esame a fresco al microscopio (Figura 3). Si è tenuto conto della conformazione, dei movimenti e dell'evidenziazione delle cellule a fiamma vibratili.



**Figura 3** – Esame a fresco dei protoscolici

### ***Estrazione del DNA***

Il contenuto delle idatidi epatiche e/o polmonari (Figura 4) è stato centrifugato a 8,000 rpm per 15 min. Il pellet contenente i protoscolici è stato risospeso in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) addizionato con SDS e proteinase K. Dopo 1 ora di incubazione a 50 °C, il DNA è stato estratto mediante due passaggi in fenolo-cloroformio e una precipitazione in etanolo e NaCl, secondo la metodica descritta da Ausubel et al. (1993). La concentrazione del DNA è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica a 260 e 280 nm (Sambrook et al., 1989).



**Figura 4** - Polmone e fegato di pecore infestate da *Echinococcus granulosus*.

## ***Produzione di una proteina ricombinante***

### ***Primers e PCR***

La proteina ricombinate è stata prodotta a partire dal gene EG95 la cui sequenza è riportata in banca dati (n° di accesso: X90928). I primers utilizzati per amplificare una porzione del gene Eg95 sono stati disegnati a partire dalla sequenza riportata in banca-dati (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) (Tabella 1).

<b>Gene</b>	<b>Primers</b>	<b>Amplicone atteso</b>
<b><i>EG95</i></b>	5'-TGGACAACTCACTATCGGCGA-3' 5'-GAATACAAAACCAGCGATTGCG-3'	<b>421 bp</b>

**Tabella 1** - Primers utilizzati per l'amplificazione del gene *Eg95*

Un  $\mu\text{l}$  di ciascun campione di DNA è stato utilizzato in  $25\mu\text{l}$  di una reazione standard di PCR costituita da:

- $2.5\mu\text{l}$  di buffer 10X (Roche);
- $1.5\mu\text{l}$  di 25 mM  $\text{MgCl}_2$ ;
- $1\mu\text{l}$  di reverse e forward primer per ciascun gene alla concentrazione di 25pmoli/ $\mu\text{l}$ ;
- $0.5\mu\text{l}$  di 1.25mM dNTP;
- $0.3\mu\text{l}$  di 5U/ $\mu\text{l}$  Taq polymerase (Roche);
- $17.2\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$ .

Le reazioni di PCR sono state effettuate in un Termal Cyclor 9700 dell'Applied Biosystems utilizzando i seguenti parametri:

- denaturazione iniziale a 95 °C per 5 minuti;
- 40 cicli di:
  - denaturazione per 1 minuto a 95 °C;
  - annealing per 1 minuto a 57 °C;

- estensione per 1 minuto a 72°C;
- Estensione finale a 72°C per 10 min.

Gli ampliconi sono stati fatti correre a 100 V in un gel di agarosio all'1%, colorati con bromuro di etidio e visualizzati sotto i raggi ultravioletti dell'apparecchio ImageMaster dell'Amersham.

### ***Sequenza nucleotidica dell'amplicone EG95.***

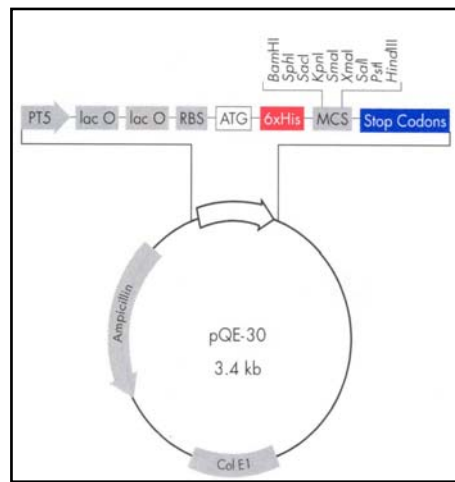
L'amplicone, ottenuto dalla coppia di primers disegnati in base alla sequenza del gene codificante per la proteina EG95 e il DNA totale estratto dai protoscolici, è stato purificato e concentrato mediante l'utilizzo di microconcentratori (Microcon PCR, Millipore). Il frammento così ottenuto è stato sequenziato in entrambe le direzioni mediante metodo di Sanger (dideoxy chain terminator method) utilizzando il sequenziatore ALFexpress (Amersham). Il confronto delle sequenze ottenute con quelle riportate in banca-dati è stato realizzato mediante l'utilizzo di programmi on-line, in particolare con ALIGN (<http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>).

### ***Estrazione degli mRNA***

L'estrazione degli mRNA (*poli A+*) è stata fatta mediante il Kit MagNA Pure LC mRNA isolation (Roche) che sfrutta l'utilizzo di particelle magnetiche. 220 mg di protoscolici, raschiati dalle membrane proligere, sono stati lavati con PBS pH 7.2 e processati secondo il protocollo riportato nel Kit. La determinazione della concentrazione degli mRNA è stata determinata allo spettrofotometro a 260 e 280 nm. Aliquote contenenti 1µg di poli A+ mRNA sono state retroscritte utilizzando l'enzima AMV reverse transcriptase (InVitrogen).

### ***Clonaggio ed espressione dell'EG95 in cellule procariotiche mediante il vettore pQE-30 (Qiagen)***

La porzione del gene EG95 è stata clonata all'interno del vettore di espressione pQE-30 (Qiagen) (Figura 5), modificandone la sequenza iniziale e finale in modo da inserire due siti di restrizione compatibili con il plasmide (i siti di restrizione inseriti sono stati *Bam*HI e *Kpn*I).



**Figura 5** - Vettore plasmidico utilizzato per l'espressione del gene *Eg95*

Per fare questo è stata eseguita una PCR utilizzando due primers modificati contenenti appunto i due siti di restrizione non presenti nella sequenza originale.

I primers, denominati EG95cod-F ed EG95cod-R, hanno amplificato una regione del gene corrispondente a 610 bp. L'amplificato ottenuto è stato prima purificato con il Kit CONCERT Gel Extraction System della GIBCO e poi digerito con gli enzimi *Bam*HI e *Kpn*I.

Contemporaneamente si è digerito il plasmide pQE-30 con gli stessi enzimi. Dopo una valutazione quantitativa della “ratio” tra l'inserto e il vettore, la “ligation” è stata effettuata mediante l'aggiunta di 1µl di T4-Ligase (Roche) a temperatura ambiente over/night.



Un'aliquota di 10µl di trasformazione è stata inserita in cellule di *Escherichia coli* DH5α competenti (Invitrogen) precedentemente risospese in una soluzione di CaCl<sub>2</sub> 50mM, contenenti il plasmide modulatore a basso numero di copie denominato pREP4. Le colonie positive sono state selezionate su piastre di Luria agar contenenti ampicillina (50 µg/ml) e kanamicina (12.5 µg/ml). Tra tutte le colonie positive, ne sono state selezionate 4 per ciascun frammento per le quali si è proceduto all'induzione.

Ogni colonia è stata fatta crescere per 18 ore (o/n) in Luria Broth (LB) contenente gli antibiotici ampicillina (50 µg/ml) e kanamicina (12.5 µg/ml). Il giorno successivo si è proceduto al rilancio in 50 ml di brodo LB senza antibiotici fino alla fase logaritmica di crescita di 0.45 O.D. stimata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 600 nm.

Raggiunta tale fase di crescita, sono state prese tre aliquote di 5 ml nelle quali si sono aggiunti 10µl di IPTG 1M. Le colture sono state ulteriormente incubate a 37°C rispettivamente per 60', 90' e 120'.

Ultimata la fase di induzione, le colture batteriche sono state centrifugate a 5000 rpm per 10 min a 4°C e risospese in 310 µl di PBS pH 7.2.

Un'aliquota di 6µl è stata fatta bollire per 5 min in loading buffer (2% SDS, 5% 2-β-mercaptoetanol, 10% glicerolo, 62.5 mM Tris), fatta correre in un gel di poliacrilamide al 12% ed infine analizzata mediante immunoblotting.

### ***Purificazione della proteina ricombinante***

Dopo l'analisi dei campioni indotti con IPTG, effettuata mediante immunoblotting, l'attenzione è stata riposta sul clone contenente il frammento da 610 bp del gene EG95 dell' *E. granulosus*. Per la purificazione della proteina di espressione è stata utilizzata una brodocoltura di 100 ml indotta per 3 ore con 2mM di IPTG.

La brodocoltura è stata poi centrifugata a 5000 rpm per 15 min ed il pellet risospeso in 1 ml di lysis buffer B (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 M Tris-HCl; pH 8.0). Questa soluzione è stata incubata per 2 ore a temperatura ambiente in leggera agitazione. Subito dopo è stata centrifugata a 12.000 rpm e il surnatante è stato fatto passare attraverso colonne di affinità al nickel (Ni-NTA Spin, Qiagen).

La concentrazione della proteina di fusione con le 6 istidine (6His) è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica a 750 nm con l'utilizzo del Kit DC-protein assay della Bio-Rad.

### ***SDS-PAGE***

L'SDS-PAGE è stato effettuato secondo la metodica descritta da Laemmli (1970). Le corse elettroforetiche sono state effettuate utilizzando l'apparecchio Mini Protean II Cell (Bio-Rad). I gels sono stati preparati in modo da avere un "separating gel" ad una concentrazione finale di acrylamide/bisacrylamide (Bio-Rad, 37.5: 1) al 12% e uno "stacking gel" al 4%. Un'aliquota di 20 µg di proteina ricombinante, è stata solubilizzata in 20 µl di loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerolo e 0.01% Bromophenol Blue), bollite per 5 min e raffreddate a 20 °C.

I campioni sono stati fatti correre in un Vertical Stab Gel Apparatus (Bio-Rad) contenente 800 ml di running buffer (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS; pH 8.3) a 200 Volts per 1 ora. La mobilità elettroforetica della proteina ricombinante è stata valutata in relazione alla mobilità elettroforetica degli standards molecolari utilizzati, costituiti da una miscela di proteine con peso molecolare compreso tra 14.4 e 97.4 kDa (Bio-Rad) e contrassegnate con colori differenti. I gels di SDS-PAGE, dopo la corsa elettroforetica, sono stati colorati con una soluzione allo 0.25% di Blue Comassie R 250 (Sigma) in 25% di isopropanolo (Sigma) e 10% di acido acetico (Carlo Erba) o processate per l'immunoblotting.

### ***Immunoblotting con siero anti-6His***

I gels, dopo la corsa elettroforetica, sono stati tenuti per 15 min in 300 ml di transfer buffer (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM glicina, 20% metanolo) e successivamente, le proteine trasferite su membrane di nitrocellulosa da 0.45µm (Sigma) mediante un SemiDry Apparatus (Bio-Rad) a 15 Volts per 1 ora. Dopo l'Western blotting, le nitrocellulose sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente (t.a.) in PBS pH 7.4 contenente 2% di skim milk (Difco, Detroit, USA).

Le nitrocellulose sono state poi messe ad incubare a 37°C per 1 ora con il siero anti-6His (Qiagen) diluito 1:1000 in PBS-2% skim milk. Dopo 4 lavaggi di 10 min ciascuno con PBS-2% skim milk a t.a. ed in leggera agitazione, le membrane sono state incubate a 37°C per 1 ora con immunoglobuline anti-IgG di topo coniugate con fosfatasi (Kirkegaard e Perry, Gaithersburg, Maryland) diluite in PBS-2% skim milk. Dopo 4 ulteriori lavaggi di 10 min ciascuno in PBS-2% skim milk, le membrane sono state messe a contatto con il substrato di sviluppo della fosfatasi contenente NBT (Nitroblue Tetrazolium, Promega) e BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate, Promega). Dopo lo sviluppo del colore, le nitrocellulose sono state lavate con H<sub>2</sub>O distillata e asciugate all'aria.

### ***Vaccinazione con la proteina ricombinante.***

Per determinare l'immunogenicità della proteina ricombinante, abbiamo utilizzato 6 agnelli di razza *sarda* di 40 giorni d'età. A norma del D.L. n°116 del 27/01/1992, in attuazione della direttiva 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati ai fini sperimentali o ad altri fini scientifici, è stata richiesta l'autorizzazione alla sperimentazione su animali (specie ovina) a scopi scientifici al Ministero della Salute con numero di protocollo 5935 del 29/06/2007. Gli agnelli sono stati sottoposti a visita clinica preliminare (analisi delle feci) mentre, per escludere presenza di anticorpi anti-echinococco, abbiamo analizzato il siero mediante immunoblotting. Prima di iniziare il protocollo di immunizzazione, l'animale è stato sottoposto a trattamento antiparassitario e ad un periodo di acclimatemento di 15 giorni. Durante la fase di acclimatemento e immunizzazione gli agnelli sono stati stabulati presso un paddock della Facoltà di Medicina Veterinaria di Sassari. Il paddock e le attrezzature ivi inserite rispondono al DLgs 116 del 27/gennaio 97 riguardante " Attuazione della direttiva n° 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali od altri fini scientifici".

### ***Protocollo di immunizzazione***

Il protocollo di vaccinazione è stato così articolato:

- un inoculo sottocute di 50 µg di r-antigene (proteina purificata emulsionata in rapporto 1:1 con l'adiuvante montanide-isa-50);
- un richiamo sottocute, dopo 1 mese, di 50 µg di r-antigene (proteina purificata emulsionata in rapporto 1:1 con adiuvante montanide-isa-50);
- un rinforzo vaccinale sottocute, dopo 7 mesi dal richiamo, utilizzando sempre 50 µg di r-antigene (proteina purificata emulsionata in rapporto 1:1 con l'adiuvante montanide-isa-50);
- un ulteriore rinforzo vaccinale sottocute, dopo 14 mesi dal richiamo, utilizzando sempre 50 µg di r-antigene (proteina purificata emulsionata in rapporto 1:1 con l'adiuvante montanide-isa-50).

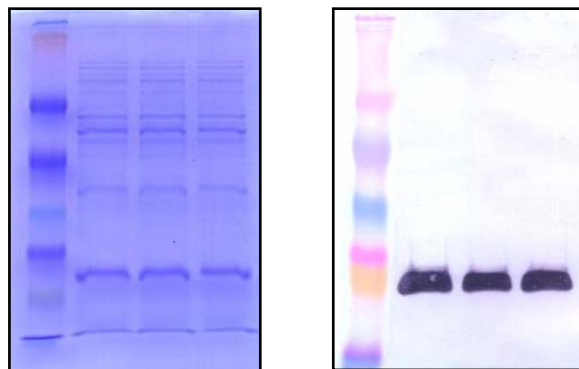
Tutti i mesi sono stati fatti i prelievi di sangue. Il sangue è stato sierato ed il siero stoccato a -20°C.

## ***Risultati***

### ***Produzione di una proteina ricombinante a partire dal gene EG95***

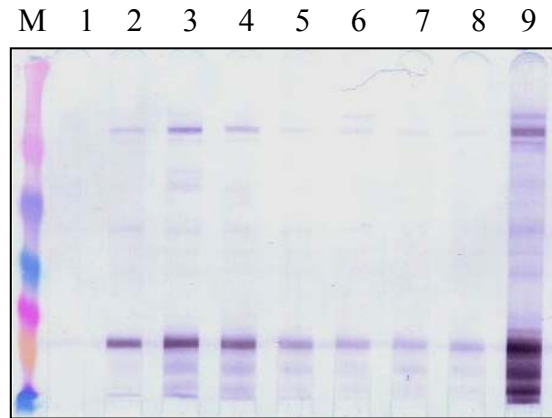
La proteina codificata dal gene EG95 è stata utilizzata dai ricercatori australiani per produrre un vaccino innocuo ed efficace (Woollard et al., 1998; Lightowlers et al., 1999). I primers ricavati dalla sequenza del gene EG95 riportata in banca-dati avrebbero dovuto amplificare una porzione di DNA di 421 bp. L'amplicone ottenuto è stato di 610 bp. Tale amplicone è stato sequenziato e la sequenza ottenuta confrontata con quella riportata in banca-dati. Le due sequenze sono risultate sovrapponibili eccetto che per un tratto di introne presente nel nostro campione di DNA e non presente nella sequenza riportata in banca-dati. Quest'ultima sequenza riporta solo l'mRNA, privo delle porzioni introniche.

La presenza di una porzione intronica nell'amplicato da 610 bp, ci ha indotto a lavorare non con il DNA ma bensì con l'mRNA. Per avere la certezza che durante l'estrazione degli mRNA non ci fossimo trascinati inquinamento da DNA, abbiamo aggiunto la DNase alla soluzione di lisi. I messengeri sono stati retro-trascritti in cDNA e su questi abbiamo impostato una PCR specifica utilizzando i primers per il gene EG95. L'amplicato ottenuto è stato sequenziato. Anche l'amplicone derivato da cDNA ha presentato lo stesso introne da 214 bp. Il frammento contenente l'introne è stato clonato in pQE e inserito all'interno degli *E. coli* DH5 $\alpha$ . Dopo 3 ore d'induzione con IPTG, la brodocoltura è stata denaturata con 8M urea e la proteina di Echinococco, purificata con le colonne di affinità al nichel (Figura 1A). La presenza del tag di 6 istidine in posizione N-terminale della proteina EG95 è stata valutata con l'anticorpo anti-(His)<sub>6</sub> prodotto in topo (Figura 1B).

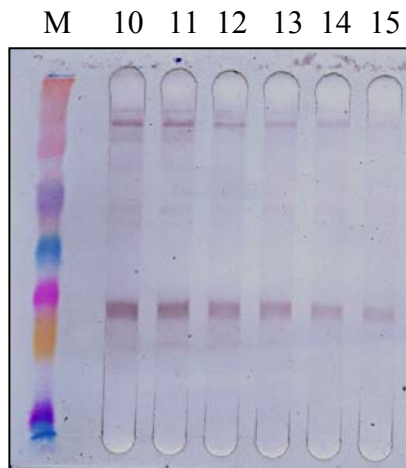


**Figura 1** - Pannello A: SDS-PAGE della proteina ricombinante EG95 in 3 frazioni eluite dalla colonna di affinità. Pannello B: immunoblotting dei campioni del pannello A con anticorpo anti-6His.

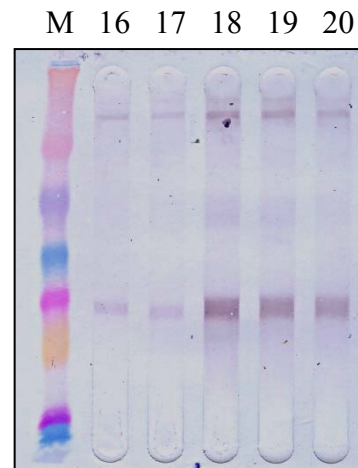
La proteina ricombinante, somministrata a 6 agnelli di razza sarda di un mese e mezzo, ha indotto una forte risposta anticorpale (Figura 2).



2A



2B



2C

**Figura 2** - Immunoblotting con i sieri degli agnelli immunizzati.

Figura 1A: Linea M, marker caleidoscopico, Linea 1, pool di sieri prelevati dagli agnelli prima della somministrazione della proteina ricombinante (Aprile 2007), linee 2-9, risposta anticorpale del sieri prelevati da Giugno 2007 a Gennaio 2008.

Figura 1B: Linea M, marker caleidoscopico, linee 10-15, risposta anticorpale dei sieri prelevati da Febbraio 2008 a Luglio 2008.

Figura 1C: Linea M, marker caleidoscopico, linee 16-20 risposta anticorpale dei sieri prelevati da Agosto 2008 a Dicembre 2008.

Oltre alla prima somministrazione effettuata ad Aprile 2007, sono stati effettuati due ulteriori rinforzi vaccinali ogni 7-8 mesi, in quanto si è avuta una progressiva diminuzione del titolo anticorpale.

## ***Considerazioni***

### ***Produzione di una proteina ricombinante***

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di produrre una proteina ricombinante partendo dalle sequenze registrate in banca dati, utilizzando DNA dei ceppi isolati. Infatti, a partire dai protoscolici di cisti epatiche e polmonari abbiamo isolato e retro-trascritto gli mRNA. Dal cDNA abbiamo amplificato il gene EG95. Dall'inserimento del gene in *E.coli* è stata prodotta una proteina ricombinate. La r-proteina derivata da tale frammento ha indotto nelle pecora trattate una forte risposta anticorpale (Figura 7).

Occorrerebbe nel prossimo futuro procedere con un'infestazione sperimentale per verificare il grado di protezione del vaccino nei confronti dell'*E. granulosus*.

Se il vaccino dovesse funzionare, potrebbe essere prodotto su scala industriale e somministrato alle pecore. Questo porterebbe ad una riduzione della prevalenza della malattia negli allevamenti ovini e, di conseguenza, ad un'interruzione nella trasmissione del parassita al cane. Pertanto l'uso del vaccino unito all'adozione di misure di controllo del randagismo e di un piano di educazione sanitaria, potrebbero aumentare l'efficacia della campagna di controllo dell'Idatidosi e alla riduzione dei tempi di attuazione.

## ***Bibliografia***

**Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., e Struhl, K.** (eds). (1993). *Current protocols in molecular biology*. Wiley Interscience, New York, N.Y.

**Capron A., Vernes A., Biguet J.** (1967). Le diagnostic immuno-electrophoretique de l'hydatidose. In : *Le Kyste Hydatique du foie*. SIMEP, Lyon, pp. 27-40.

**Craig P.S., Pawlowski Z.S.** (2001). *Cestode zoonoses: Echinococcosis and cysticercosis, an emergent and global problem*. NATO Sciences Series. IOS press, vol. 341:1-265

**Eckert J., Deplazes P.** (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin. Microbio. Rev.* 17: 107-135.

**Heath D.D., Lawrence S.B.** (1976). *Echinococcus granulosus*: development in vitro from oncosphere to immature hydatid cyst. *Parasitology* 73:417-23.

**Heath D.D., Lawrence S.B.** (1996). Antigenic polypeptides of *Echinococcus granulosus* oncospheres and definition of protective molecules. *Parasite Immunology* 18:347-357.

**Lightowers M.W., Lawrence S.B., Gauci C.G. Young J., Ralston M.J. Maas D., Heath D.D.** (1996). Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunology* 18: 457-462.

**Lightowers M.W., Jensen O., Fernandez E., Iriarte J.A. Woollard D.J., Gauci C.G., Jenkins D.J., Heath D.D.** (1999). Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *International Journal for Parasitology* 29: 531-534.



**Sambrook J., Fritsch E. F., e Maniatis T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

**Schantz P.M., Gottstein B.** (1986). Echinococcosis (hydatidosis), Vol 1. Academic Press Inc., Orlando, Florida.

**Smith D.B., Johnson K.S.** (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67:31-40.

**WHO**, 2001. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. WHO/OIE, Paris

**Woollard D.J., Gauci C.G., Heath D.D., Lightowers M.W.** (1998). Epitope specification and antibody responses to the EG95 hydatid vaccine. *Parasite Immunology* 20:535-540