



## PHÁT HIỆN QUYẾT ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN TRONG PHÂN TỬ PROTEIN AS16 CỦA *ASCARIS SUUM*, ỨNG DỤNG TRONG SẢN XUẤT VẮC-XIN TÁI TỔ HỢP PHÒNG BỆNH GIUN Đũa Ở HEO

Nguyễn Thanh Lãm<sup>1</sup> và Yasunobu Matsumoto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/9/2014

Ngày chấp nhận: 07/11/2014

### Title:

Identification of epitopes within *Ascaris suum* 16 protein, an application in production of recombinant vaccine against roundworm in pigs

### Từ khóa:

*Ascaris suum*, protein AS16, vắc-xin, heo

### Keywords:

*Ascaris suum*, protein AS16, vaccine, pigs

### ABSTRACT

*Ascaris suum* is a popular parasitic roundworm that infests pigs resulting failure of health, performance and causing considerable economic losses. Recombinant vaccines have shown promise for prevention of several helminth infestations. Several studies have shown that native protein 16-kilodalton (AS16) which was found in larvae and adult worm intestine, hypodermis, and cuticles can induce antibody responses against *A. suum* larvae in mice and pigs. In this study, hydrophobicity and hydrophilicity of AS16, which might correlate with antigenicity/immunogenicity characterized by the whole protein, was analyzed by Genetyx version 10.0. Vaccinal effects of recombinant protein AS16 were analyzed in experimental mice BALB/c. The results of this study showed that major epitope of protein AS16 predictably locates within 30G - 60A region and mice intranasally vaccinated with *Escherichia coli*-expressed recombinant AS16, generated a significant increase in the level of rAS16-specific antibody responses. Findings of this study provide significant reference for vaccine candidate production based on recombinant-epitope expression against ascariasis in pigs.

### TÓM TẮT

*Ascaris suum* là loại giun tròn ký sinh phổ biến trên heo, làm giảm khả năng tăng trọng của vật chủ, gây tổn thất kinh tế đáng kể cho người nuôi. Trong những năm gần đây, vắc-xin tái tổ hợp được đánh giá như là một trong những phương pháp phòng chống bệnh hiệu quả cho vật nuôi, trong đó có bệnh giun đũa ở heo. Một số nghiên cứu đã chứng minh, protein 16-kilodalton (AS16) được phát hiện từ ấu trùng và giun đũa trưởng thành có khả năng tạo phản ứng miễn dịch trên chuột và heo. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân tích các đặc điểm về tính kỵ nước và ưa nước của phân tử protein AS16 dựa trên phần mềm Genetyx phiên bản 10.0 để dự đoán vị trí quyết định kháng nguyên trong phân tử này và tiến hành đánh giá hiệu quả miễn dịch của phân tử protein tái tổ hợp AS16 được tìm kiếm ở chuột thí nghiệm BALB/c. Kết quả cho thấy, quyết định kháng nguyên của phân tử protein AS16 được dự đoán định vị tại vị trí 30G - 60A, chuột được tiêm với phân tử protein tái tổ hợp AS16 với GST được biểu hiện qua *Escherichia coli* BL21, đã tạo phản ứng miễn dịch ý nghĩa trên chuột. Những kết quả thu được sẽ là nội dung tham khảo quan trọng trong việc sản xuất vắc-xin tái tổ hợp dựa trên quyết định kháng nguyên 30G - 60A để phòng bệnh giun đũa ở heo.

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

*Ascaris lumbricoides* và *Ascaris suum* (thuộc họ Ascarididae) là nhóm ký sinh phổ biến ở người và heo. Giun đũa *A. lumbricoides* gây nhiễm gần 1,2 tỷ người trên toàn thế giới (De Silva *et al.*, 2003). Sự lây nhiễm ký sinh này ở người được ghi nhận chủ yếu ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới (WHO, 2006). Bên cạnh đó, *A. suum* là một loài ký sinh gây bệnh giun đũa ở heo với tỷ lệ cao (Roepstorff, 1998; Nansen, 1999). Giun đũa ở heo gây ảnh hưởng đến sức khỏe và làm giảm năng suất của heo, dẫn đến những thiệt hại kinh tế đáng kể cho ngành chăn nuôi (Stewart, 1988). Nhiều nghiên cứu đã cho thấy hai loài này có đặc điểm sinh học gần nhau như về di truyền, tính sinh miễn dịch và đặc điểm gây bệnh. Một số nghiên cứu cũng đã chứng minh rằng *A. lumbricoides* ở người có thể lây nhiễm sang heo và ngược lại (Takata, 1951; Galvin, 1968). Hơn nữa, một số tác giả khẳng định rằng heo có thể nguồn lây nhiễm giun đũa cho con người (Anderson, 1995; Peng, 2003). Do đó, việc kiểm soát bệnh giun đũa ở động vật cần phải được quan tâm, được xem như là một trong những giải pháp làm giảm bệnh đũa ở người gây ra bởi *A. suum*.

Mặc dù có nhiều loại kháng nguyên đã được nghiên cứu trong việc phòng bệnh giun đũa được thực hiện ở phòng thí nghiệm, tuy nhiên những kháng nguyên này mang tính tương đồng với protein của vật chủ, điều này có thể gây ra sự không hiệu quả trong quá trình tạo miễn dịch khi được tiêm phòng. Protein *A. suum* 16 kDa (AS16) được phát hiện từ dịch xuất của ấu trùng L3 của giun đũa, được xác định thành phần ở các vị trí trong ruột, lớp hạ bì ở cả ấu trùng và giun trưởng thành, hiện diện cả giun đũa người và heo mà không có sự tương đồng protein của động vật có vú (Tsuji *et al.*, 2003). Khả năng sinh miễn dịch của AS16 được xác định trên chuột thí nghiệm và kháng thể sinh ra từ kháng nguyên này giúp giảm số lượng ấu trùng xuất hiện ở chuột gây nhiễm (Tsuji *et al.*, 2003). Từ những lý do trên, phân tử protein AS16 được lựa chọn để biểu hiện qua phương pháp tổng hợp protein tái tổ hợp nhằm phục vụ cho sản xuất thương mại. Các đặc điểm về kháng nguyên protein AS16 và hiệu quả tạo miễn dịch của vắc-xin tái tổ hợp này được xác định. Kết quả nghiên cứu có thể thông tin quan trọng cho việc sản xuất vaccine tái tổ hợp phòng chống bệnh giun đũa ở heo cũng như ở người.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu thí nghiệm

#### Động vật thí nghiệm

Chuột bạch BABL/c, sạch bệnh, từ 6-8 tuần tuổi (Japan Clea Co. Tokyo, Japan) được sử dụng trong nghiên cứu này. Chuột được nuôi trong phòng thí nghiệm đạt yêu cầu. Các thí nghiệm trên động vật được thực hiện theo bộ tiêu chuẩn của trường Đại học Tokyo.

#### Thiết bị

Máy ly tâm lạnh, máy luân nhiệt, buồng cấy, tủ âm, máy đọc ELISA VERSA max microplate reader, máy quang phổ, bộ điện di protein và Western blot.

#### Hóa chất sinh phẩm

Bộ kit dung hợp DNA Ver2.1 (Takara Bio INC, Japan), enzyme cắt giới hạn EcoRI, XhoI (Takara, Nhật Bản), bộ kit phản ứng PCR (Toyobo, Nhật Bản), bộ kit ly trích DNA Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, USA), chủng *E.coli* BL21 biểu hiện (In vitro, Carlsbad CA, USA), bộ kit ly trích protein tái tổ hợp affinity matrix Glutathione Sepharose® 4B (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), kháng thể đối chứng dương AS16 (Viện Thú y Quốc gia Nhật Bản), kháng thể đối chứng âm được lấy chuột sạch bệnh, kháng thể thứ hai được lấy từ kháng huyết thanh thỏ (rabbit antimouse IgG antibodies) (Benthyll, Delta West, Australia) được sử dụng trong ELISA và Western blot, TMB peroxidase (KPL Inc, Maryland, USA).

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### Phân tích đặc điểm hóa học dựa trên phân mềm

Gene mã hóa protein AS16 từ *A. suum* (chuỗi trình tự được trích từ dữ liệu ngân hàng gene DDBJ/EMBL/Genbank database với số truy cập AB089179) được đăng ký bởi National Center for Biotechnology Information (NCBI). Trong nghiên cứu này AS16 có 396bp mã hóa cho các amino acid từ 19Q đến 150A. Phần mềm Genetyx 10.0-Win DNA (Software Inc, Tokyo, Japan) được sử dụng để phân tích các đặc điểm hóa học, trình tự mã hóa cho phân tử protein. Trọng lượng phân tử, đặc điểm kỵ nước và ưa nước, điểm đẳng điện pI (isoelectric point) cũng được xác định.

#### Phản ứng PCR khuếch đại DNA

Chuẩn bị dung hợp vào pGex-5X3 vector: Để chuẩn bị nhân dòng gene đích AS16 vào vector biểu hiện pGex-5X3 (GE Healthcare, Uppsala,

Sweden). Chuỗi trình tự DNA của AS16 được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng bộ cặp mồi được thiết kế bởi phòng thí nghiệm Laboratory of Global Animal Resources Science.

(mồi xuôi 5'GGGGAATTCATGCCAAACAC CATCACGCGTACCA 3')

mồi ngược 5'CCCCTCGAGTTACGCACCG CCAGCGATTGC 3').

Quá trình tổng hợp DNA được thực hiện qua 35 chu kỳ với chu trình nhiệt như sau:

Giai đoạn biến tính ở 98°C: 10 giây,

Giai đoạn bắt cặp ở 60°C: 30 giây,

Giai đoạn tổng hợp 68°C: 60 giây.

Trên cặp đoạn này mồi có thiết kế trình tự của hai enzyme cắt giới hạn EcoRI nằm trên đoạn mồi xuôi và XhoI trên đoạn mồi ngược. Cả hai sản phẩm PCR và vector biểu hiện pGex-5X3 được cắt bởi hai enzyme cắt giới hạn trên. Cuối cùng sản phẩm đích từ PCR được dung hợp với plasmid bằng bộ kit DNA Ver2.1 (Takara Bio INC, Japan).

Chuẩn bị dung hợp pColdI vector: Quy trình dung hợp AS16 vào vector biểu hiện pColdI được thực hiện tương tự như mô tả trên.

#### *Sản xuất protein tái tổ hợp (AS16\_GST)*

Protein tái tổ hợp AS16 dung hợp với GST (Glutathione S transferase) và His-tagged (Histidine tagged) được tổng hợp trên vi khuẩn *E. coli* dòng BL21. Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất của mỗi loại vector biểu hiện.

#### *Tiêm chủng*

Chuột thí nghiệm được phân thành 2 nhóm (10 con/nhóm). Nhóm thứ nhất, mỗi chuột được tiêm 50 µg protein tái tổ hợp AS16\_GST kết hợp với tá được Freund's Complete Adjuvant (FCA, DIFCO, Detroit, MI, USA) với thể tích 200 µl. Nhóm thứ hai chỉ được tiêm với FCA như nhóm đối chứng. Tất cả các nhóm được tiêm chủng dưới da lặp lại 3 lần với nồng độ protein giống nhau lần lượt vào các ngày 1, ngày 14 và ngày 21. Huyết thanh cuối cùng được thu thập sau 2 tuần từ lần tiêm chủng thứ ba để kiểm tra phản ứng miễn dịch. Bố trí thí nghiệm được thực hiện qua 3 lần lặp lại. Hiệu giá kháng thể được xác định bằng độ hấp phụ trung bình ± SD.

#### **2.3 Phản ứng ELISA và phản ứng Western blot**

Để xác định tính sinh miễn dịch của phân tử protein, phản ứng ELISA và Western blot được sử dụng.

#### *Phản ứng ELISA*

Đĩa nhựa 96 giếng (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) được phủ với 25 ng cho mỗi giếng trong 50 µl protein tái tổ hợp rAS16\_His được pha với bicarbonate buffer 0,1M và ủ ở 4°C trong 12h. Các giếng được rửa sạch với 0.1% Triton-X 100/PBS sau đó được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ với 200 µl 3% skim milk/PBS. Các giếng tiếp tục được ủ ở 37°C với 100 µl huyết thanh được thu thập được pha với 1% skim milk/PBS. Các giếng được ủ trong vòng 1 giờ với 100 µl kháng huyết thanh ngựa (Benthy1, Delta West, Australia) với độ pha loãng 1:2.000. Giếng được rửa 30 phút trong phòng tối với 100 µl TMB peroxidase (KPL Inc, Maryland, USA). Phản ứng được kết thúc với 50 µl 1M H2SO4. Phản ứng kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể trong ELISA được xác định bởi giá trị độ mật quang ở bước sóng 450 nm bằng máy đọc VERSA max microplate reader (Molecular devices, California, USA).

#### *Phản ứng Western blot*

0,01 µg protein tái tổ hợp AS16 với GST được sử dụng trong điện di protein gel 15% SDS-PAGE, sau đó được chuyển sang màng lọc PVDF Immobilon-P kích thước 0,45 µm (Millipore, MA, USA), tiếp theo màng lọc được ủ với huyết thanh kháng protein tái tổ hợp AS16\_His (kháng thể thứ nhất). Sau đó, màng PVDF tiếp tục được ủ với kháng huyết thanh chuột (kháng thể thứ hai) (Benthy1, Delta West, Australia). Sau khi được ủ với kháng thể thứ hai, protein được hiển thị với tác chất ECL western blotting.

#### **2.4 Phân tích thống kê**

Hiệu giá kháng thể trong phản ứng ELISA được xác định bằng giá trị OD450 nm. So sánh sự khác biệt giá trị trung bình OD giữa các nhóm tiêm chủng được thực hiện phân tích Anova một chiều và phép thử T, với độ tin cậy 95%.

### **3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

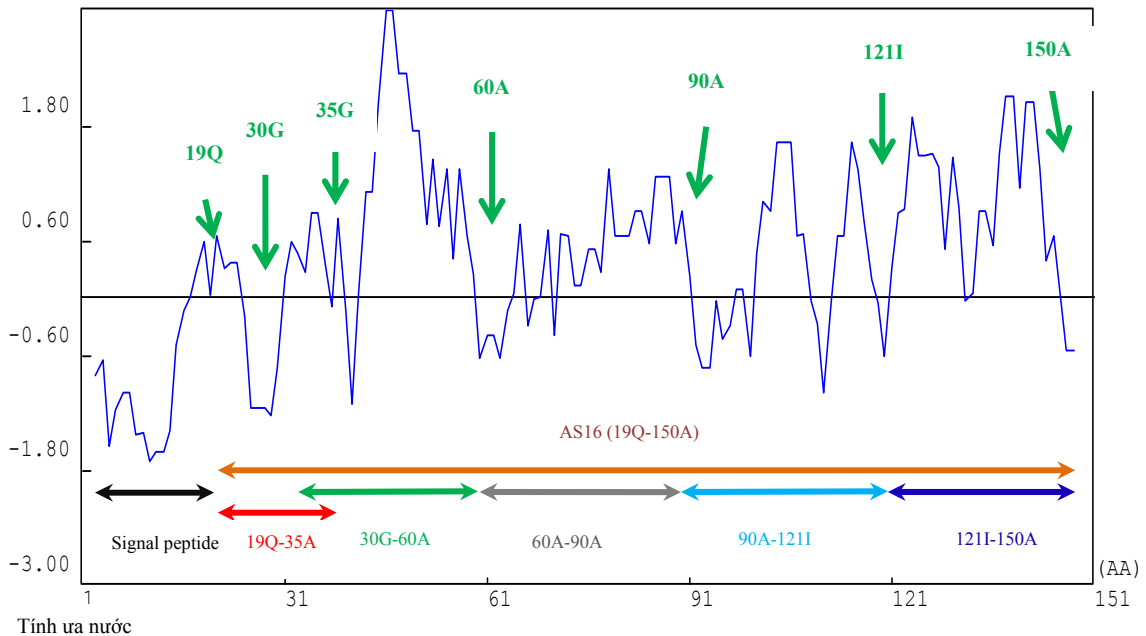
#### **3.1 Kết quả phân tích đặc điểm kháng nguyên của AS16 bằng phần mềm Genetyx 10.0**

Phân tử protein AS16 được kết hợp từ 132 acid amin, không bao gồm peptide tín hiệu (signal peptide), được chia ra thành 5 đoạn peptide gồm khoảng 30 acid amin cho mỗi đoạn. Sự phân chia này được thực hiện dựa trên tính toán các vùng kỵ nước và ưa nước trong phân tử protein AS16. Những đặc điểm kỵ nước và ưa nước này có thể liên quan trực tiếp đến đặc điểm kháng nguyên và

tính sinh miễn dịch của phân tử protein AS16. Phân tích đặc điểm sinh hóa của protein được xác định dựa theo phương pháp của Hoop-Woods và được thực hiện trên phần mềm Genetyx 10.0. Qua Hình 1 cho thấy, mức độ kỵ nước của phân tử protein AS16 được xác định trong vùng AS16.30-60. Các vùng kỵ nước tiếp theo được sắp xếp theo các vị trí lần lượt là AS16.121-150, AS16.90-121, AS16.60-90. Ngược lại, phân đoạn AS16.19-35 là đoạn ưa nước nhất.

Dựa trên kết quả phân tích phần mềm, chúng ta có thể xác định đặc điểm sinh hóa và dự đoán vị trí quyết định kháng nguyên trước khi thực hiện các thí nghiệm kiểm tra tính sinh miễn dịch của kháng nguyên này. Theo Hopp and Woods, 1981 có thể dự đoán được vị trí của những quyết định kháng nguyên nằm vào những đoạn ưa nước trong một phân tử protein. Do đó, từ phân tích những đặc điểm trên cho thấy những quyết định kháng nguyên quan trọng của phân tử protein AS16 có thể định vị tại các phân vùng AS16.30-60, AS16.90-121 và AS16.121-150.

Tính kỵ nước



**Hình 1: Đặc điểm ưa nước và kỵ nước của phân tử protein AS16. Phân tích hóa học của phân tử protein được thực hiện trên phần mềm Genetyx 10.0. Đặc điểm kỵ nước và ưa nước được xác định theo phương pháp Hoop-Woods**

**3.2 Biểu hiện và phân tích đặc điểm hóa học của protein tái tổ hợp AS16**

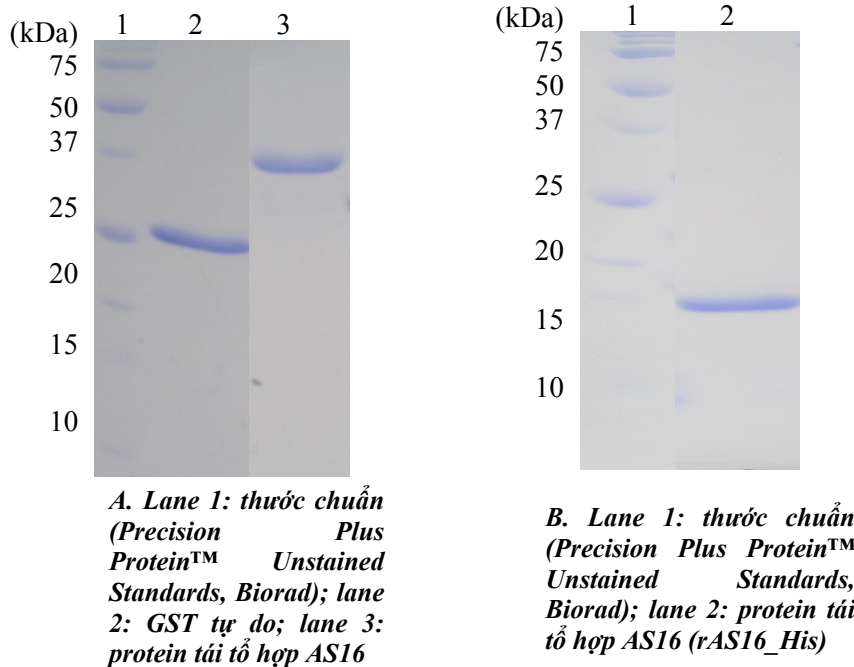
Để tránh phản ứng chéo từ trên cùng đoạn protein dung hợp, hai vector gồm pGex-5X3 và pColdI, hình thành nên lần lượt hai protein tái tổ hợp Glutathione S transferase (GST) và Histidine-tagged (His-tagged). Đoạn gene mã hóa cho protein AS16 được tổng hợp bằng phản ứng PCR. Sản phẩm khuếch đại từ phản ứng PCR được chèn vào các vector biểu hiện trên. Sự tổng hợp protein tái tổ hợp được thực hiện qua vi khuẩn *E. coli* dòng BL21.

Protein tái tổ hợp trong GST head được tinh lọc bằng phương pháp sắc ký ái lực (affinity chromatography). Dịch chiết xuất từ tế bào *E. coli* được tinh lọc để có protein tái tổ hợp tinh khiết. Qua biểu hiện trên gel điện di SDS-PAGE, protein tái tổ hợp chiết xuất được xác định đạt độ tinh khiết là 99%.

Vì trọng lượng phân tử của phần GST là 26kDa, do đó, tổng trọng lượng phân tử của protein tái tổ hợp AS16\_GST là 40,50 kDa. Tuy nhiên, trọng lượng phân tử quan sát được của protein tái tổ hợp rAS16 là 37,5 kDa. Tương tự, protein AS16 cũng được tổng hợp từ vector biểu hiện pColdI ở 15°C và được chiết xuất bằng Ni-NTA agarose

trong cột sắc ký. Protein mục tiêu được quan sát trên SDS-PAGE với trọng lượng phân tử là 18kDa. Sự khác biệt giữa trọng lượng phân tử lý thuyết và biểu hiện trên SDS-PAGE cũng được nhận biết trong biểu hiện protein tái tổ hợp với His-tagged. Theo lý thuyết, protein tái tổ hợp AS16\_GST được cấu tạo từ 2 phân đoạn AS16 và GST do đó, sau khi thực hiện phản ứng phân cắt 2 phân này sẽ tách rời và được biểu hiện trên SDS-PAGE theo trọng lượng phân tử tương ứng lần lượt AS16:14,5kDa

và GST:26kDa. Tuy nhiên, qua phản ứng điện di protein, AS16 protein không được phát hiện trên SDS-PAGE sau khi sử dụng yếu tố Xa (Novagen, EMD Biosciences, Germany), trọng lượng của GST sau phản ứng cắt di chuyển cùng vị trí của GST tự do (kết quả không được công bố). Điều này chứng tỏ, đặc điểm hóa học tự nhiên của đoạn protein AS16 này đã tạo nên sự di chuyển khác với kích thước lý thuyết.



**Hình 2: Biểu hiện protein tái tổ hợp AS16 với GST và Histidine-tagged trên điện di SDS-PAGE 15%**

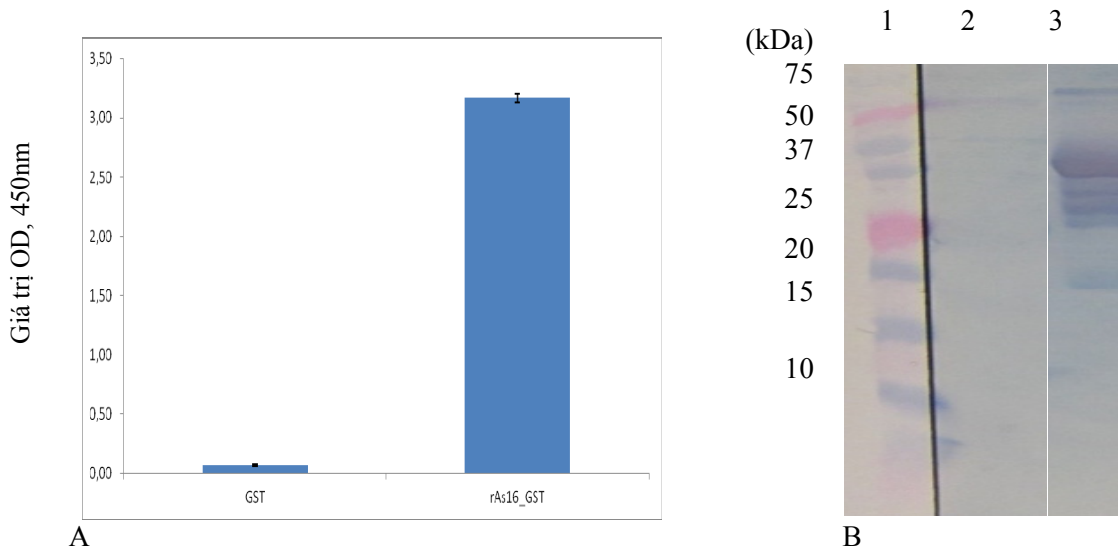
A. Biểu hiện protein tái tổ hợp AS16 với GST. B. Biểu hiện protein tái tổ hợp AS16 với Histidine tagged

**3.3 Đánh giá tính trội miễn dịch (immunodominance) của protein tái tổ hợp AS16 bằng phương pháp ELISA và Western blot**

Đặc điểm kháng nguyên của protein tái tổ hợp AS16 được đánh giá qua phản ứng ELISA và Western blot. Protein dung hợp với GST được chiết xuất sử dụng như là kháng nguyên trong phản ứng ELISA và được xác định bởi kháng thể đặc hiệu AS16 thu được từ chuột được tiêm với protein tái tổ hợp AS16 với His-tagged (rAS16\_His) độ pha loãng 1:4.000. Tín hiệu phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể được đo bởi giá trị độ mật quang ở bước sóng 450 nm. Qua Hình 3 cho thấy, không có phản ứng giữa kháng nguyên được sử dụng là GST tự do và kháng thể kháng rAS16\_His.

Điều này cho thấy không có phản ứng chéo giữa kháng thể kháng AS16\_His và protein GST.

Tính kháng nguyên của protein AS16 tiếp tục được phân tích bằng phản ứng Western blot. Protein tái tổ hợp với GST protein được đưa vào gel điện di SDS-PAGE, sau đó được chuyển sang màng lọc PVDF. Phản ứng miễn dịch được biểu hiện bằng TMB substract. Đặc điểm kháng nguyên được phân biệt qua độ đậm của vạch protein trên màng PVDF. Kết quả cho thấy, protein AS16 được phát hiện bởi kháng thể rAS16\_His, trong khi đó thì không có tín hiệu của phản ứng giữa GST tự do và kháng thể kháng rAS16\_His. Kết quả này giúp xác nhận cho kết quả phân tích từ ELISA.



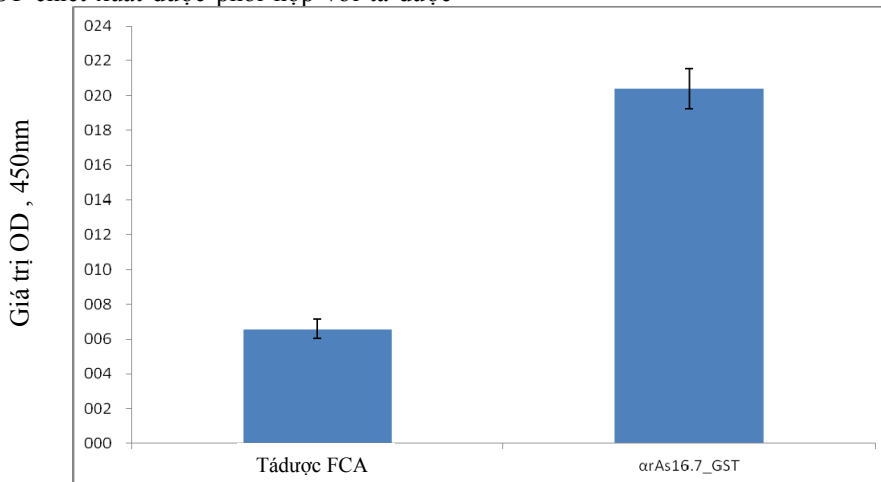
**Hình 3: Đánh giá tính trội miễn dịch của protein tái tổ hợp AS16 bằng phương pháp ELISA và Western blot**

A. So sánh tính trội miễn dịch giữa protein tái tổ hợp AS16\_GST và GST tự do được sử dụng như kháng nguyên trong phản ứng ELISA ( $p < 0,05$ ). B. Kết quả phân tích tính sinh miễn dịch được khẳng định bằng phản ứng Western blot. Lane 1: thước chuẩn, lane 2: GST tự do, lane 3: AS16\_GST

**3.4 Đánh giá tính sinh miễn dịch (immunogenicity) của protein tái tổ hợp AS16\_GST**

Protein tái tổ hợp gắn với GST được sử dụng như là kháng nguyên sinh miễn dịch (immunogens) tiêm chủng cho chuột BABL/c. Protein tái tổ hợp AS16\_GST chiết xuất được phối hợp với tá được

FCA trong tiêm chủng để đạt miễn dịch tối ưu. Hiệu giá kháng thể của chuột tiêm phòng được xác định bằng phản ứng ELISA. Qua kết quả cho thấy, chuột tiêm với AS16 có phản ứng miễn dịch đặc hiệu cao hơn so với nhóm chỉ tiêm tá được FCA và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).



**Hình 4: Phản ứng miễn dịch của chuột được tiêm với rAS16\_GST**

Hiệu giá được biểu hiện lũy thừa 2 ( $p < 0,05$ )

**4 KẾT LUẬN**

– Từ những phân tích đặc điểm hóa học của phân tử protein AS16 bằng phần mềm Genetyx 10.0, quyết định kháng nguyên chủ của yếu phân tử

này được dự đoán định vị tại phân đoạn 30G – 60A. Điều này gợi ý cho những nghiên cứu sau này về việc sử dụng peptide 30G – 60A trong việc sản xuất protein tái tổ hợp nhằm nâng cao hiệu quả miễn dịch phòng chống bệnh giun đũa ở heo.

– Protein tái tổ hợp AS16 dung hợp với GST và His-tagged tương đồng với đặc điểm của protein AS16 tự nhiên và AS16\_GST tạo phản ứng miễn dịch hiệu quả ở chuột thí nghiệm. Điều này mang lại cho việc phòng chống bệnh giun đũa ở heo và người bằng protein tái tổ hợp.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Roepstorff, A. 2003. *Ascaris suum* in pigs: population biology and epidemiology. Danish Centre for Experimental Parasitology. The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen. p. 113.
2. De Silva NR, Brooker PJ, Hotez A, Montessoro DE, Savioli L, 2003. Soil transmitted helminth infections: Updating the global picture. *Trends Parasitol*; 19: 547-51.
3. Hopp, T. P. and Woods, K. R, 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78: 3824-8.
4. Takata, I 1951. Experimental infection of man with *Ascaris* of man and the pig, *Kitasato Arch. Exp. Med.* 23, 151.
5. Nansen, I., Roepstorff, A. 1999. Parasitic helminths of the pig: factors influencing transmission and infection levels, *Int. J. Parasitol.* 29.
6. Stewart, T.B., Hale, O.M. 1998. Losses to internal parasites in swine production, *J. Anim. Sci.* 66.
7. Galvin, T.J. 1968. Development of human and pig *Ascaris* in the pig and rabbit. *J. Parasitol.* 54.
8. Anderson, T.J.C. 1995. *Ascaris* infections in humans from North America: molecular evidence for cross-infection, *Parasitology* 110.
9. Tsuji, N., Suzuki, K., Kasuga, H., Isobe, T., Arakawa, T., Matsumoto, Y., 2003. Mice intranasally immunized with a recombinant 16-kilodalton antigen from the roundworm *Ascaris* parasites are protected against larval migration of *Ascaris suum*. *Infect. Immun.* 71, 5314–5323.
10. W. Peng, T.J.C. Anderson, X. Zhou, M.W. Kennedy, 1998. Genetic variation in sympatric *Ascaris* populations from humans and pigs in China, *Parasitology* 117.
11. World Health Organization (WHO), 2006. Preventive chemotherapy in human helminthiasis. Coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: A manual for health professionals and programme managers.