



Parazitoloji'de DNA Aşı Çalışmaları

Muhammed Ahmed SELÇUK^{1,a}
Figen ÇELİK^{2,b}
Sami ŞİMŞEK^{2,c}

¹ Siirt Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı,
Siirt, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0003-1769-4558

^b ORCID: 0000-0002-2188-0196

^c ORCID: 0000-0002-3567-326X

Paraziter hastalıklar, dünya çapında insan ve hayvan sağlığında çok önemli bir yer işgal etmektedir. Paraziter enfeksiyonların kontrolü ve önlenmesinde parazit yükünün azaltılması çok önemli bir hedeftir ancak tek başına uygulanamaz. Bu nedenle, sadece parazit yükünü değil aynı zamanda parazit bulaşma riskini de azaltmak için çevresel ve ekolojik değişikliklerin uygulanması gerekmektedir. Aşılar en etkili, güvenilir ve sürdürülebilir yöntemlerdir ve bu açıdan parazitler hastalıkları kontrol etmek için alternatif çözümler olarak da düşünülmektedir. Bu amaçla farmakolojik ilaçlar ve pestisitlerin kullanımına olan bağımlılığı da azaltmada faydalıdır. DNA aşılması, immünojenik bir yanıt üretmek için genetik olarak tasarlanmış olan DNA'yı kullanan yeni bir teknolojik metoddur. Bu amaca ulaşmak için önemli bir strateji, üzerlerinde kodlanmış antijenlere sahip DNA plazmidlerini kullanmaktır. Bu antijen kodlayan DNA plazmid, parazitlere, bakterilere ve hastalık üreten virüslere karşı humoral ve hücrel bağışıklık tepkisini indükleyebilir niteliktedir. DNA aşıları, günümüzde gelişmekte olan bir subunit aşı türüdür. Bu derlemede, DNA aşılarının üretim ve etki mekanizmaları hakkında detaylı bilgiler verilmiş, parazitler hastalıklarına karşı yapılan DNA aşı çalışmaları hakkında bilgiler sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Parazit, DNA aşısı, plazmid, bağışıklık

DNA Vaccine Studies in Parasitology

Parasitic diseases occupy a very important place in human and animal health worldwide. Reducing the parasite load is a very important goal in the control and prevention of parasitic infections, but it cannot be applied alone. Therefore, environmental and ecological changes need to be implemented to reduce not only the parasite load but also the risk of parasite transmission. Vaccines are the most effective, safe and sustainable methods, and in this regard, they are also considered as alternative solutions to control parasitic diseases and are useful in reducing dependence on pharmacological drugs and the use of pesticides. DNA vaccination is a new technological method that uses genetically engineered DNA to generate an immunological response. An important strategy to achieve this goal is to use DNA plasmids with encoded antigens on them. This antigen-encoding DNA plasmid is capable of inducing the humoral and cellular immune response against parasites, bacteria and disease-producing viruses. DNA vaccines are a type of subunit vaccine currently in development. In this review, detailed information about the production and mechanism of action of DNA vaccines is given, and information about DNA vaccine studies against parasitic diseases is presented.

Key Words: Parasite, DNA vaccine, plasmid, immunity

Giriş

İnsan ve hayvanların sağlığını olumsuz etkileyen, bağışıklığını kıran, çalışma verimini düşüren ve ölümüne neden olan parazitler, organizmada farklı doku ve organlara yerleşirler ve bundan dolayı çeşitli patojenik etki sonucunda birbirinden farklı hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olurlar. Günümüzde az gelişmiş ülkeler halen daha parazitler hastalıkları ile uğraşırken, gelişmiş ülkeler bilinçli ve sistemli bir şekilde yaptıkları tedavi, koruma ve kontroller ile hastalıkların çoğunu ortadan kaldırmışlar, hatta büyük bir kısmını da kontrol altına almışlardır. Buna rağmen yine de parazitler hastalıklar önemini korumaktadır, çünkü tüm önlemlere rağmen halen daha sayılarını azaltmak mümkün olmamıştır (1).

Son zamanlarda parazitler enfeksiyonların oranındaki artışa rağmen, bunların tedavisine yönelik çalışmaların sayısı, enfeksiyonların halk sağlığı üzerindeki önemli etkilerini değerlendirmek için yeterli olamamıştır. Bunun ana sebebi, bu alandaki araştırma ve geliştirmelerin, ilaç endüstrisi için ekonomik olarak etkileyici bir yanının olmamasıdır (2). Hayvancılık sektöründe özellikle büyük çiftlik işletmelerinde parazitler hastalıklar oldukça fazla görülmektedir. Uzun süreli parazitler hastalıklarının varlığı, yüksek miktarlarda antiparazitik ilaç kullanımını gerektirmekte ve bu tür kemoprofilaksi ve kemoterapinin uzun bir süre boyunca uygulanması zor ve maliyetli olmakla birlikte bu durum süt, süt ürünleri ve ette ilaç kalıntıları gibi sorunlara yol açmaktadır (3). Uzun bir süre ilaç kullanımına bağlı gelişen direnç durumu geliştirilen aşıların önemli bir hale gelmesine neden olmaktadır. Bu amaçla hem moleküler biyoloji hem de genetik mühendisliği alanlarının hızla gelişmesi, aşı üretiminde yeni tekniklerin doğmasına yol açmıştır (4).

Geliş Tarihi : 28.02.2022

Kabul Tarihi : 06.04.2022

Yazışma Adresi Correspondence

Sami ŞİMŞEK
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı
Elazığ – TÜRKİYE

ssimsek@firat.edu.tr

1. DNA Aşıları

Aşılar, canlıların hastalıklara karşı bağışıklık kazanmaları amacıyla geliştirilen en etkili, güvenilir biyolojik maddelerdir. Farmakolojik ilaçlara ve pestisitlerin kullanımına olan bağımlılığı azaltmada da faydalı olan bu aşılar paraziter hastalıkları kontrol etmek için alternatif çözümler olarak da düşünülmektedir. Uygulanan farklı teknolojiler ile yeni aşılarda geliştirilmesi için sentetik peptidler, DNA aşıları ve rekombinant vektör aşıları umut verici seçeneklerdir (5).

1.1. Tanımı ve Özellikleri

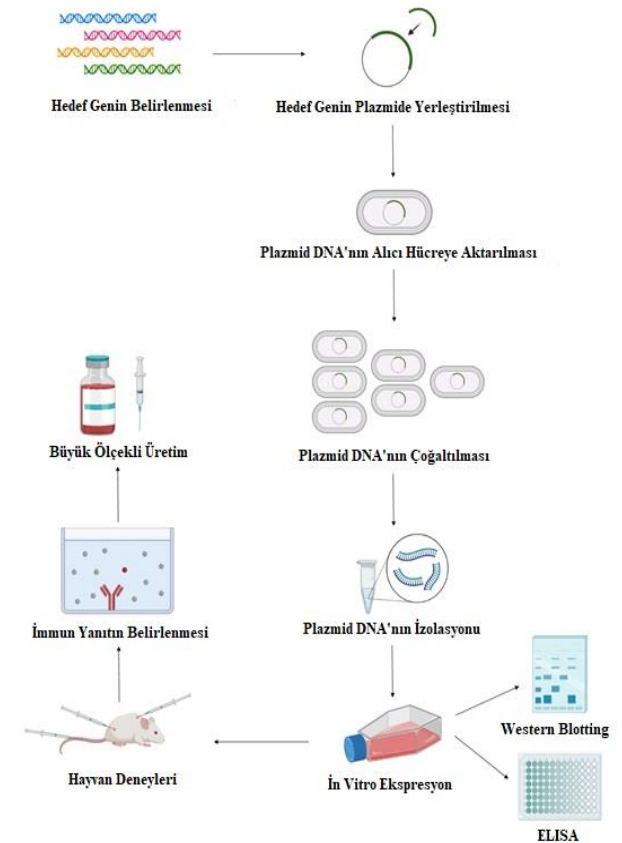
DNA aşılması, immünojenik bir yanıt üretmek için genetik olarak tasarlanmış olan DNA'yı kullanan yeni bir teknolojik metoddur. DNA aşıları, günümüzde gelişmekte olan bir subunit aşı türüdür. Bu tip aşıda, patojenin DNA'sının bir kısmı bir bakteriyel araç vektörüne yerleştirilir ve kas içine, deri içine veya deri altına enjekte edilir. DNA dokuya enjekte edildikten sonra bazı hücreler vektörü alır ve daha sonra çekirdeğe transloke olur ve burada kopyalanıp sanki konak DNA'sıymış gibi transkripsiyon yapılır, üretiminin ardından oluşan protein, yabancı cisim olarak tanıtıldığı için bağışıklık sistemine sunulur. DNA aşıları, güvenlik, üretim kolaylığı, stabilite ve immünojenite açısından diğer aşı teknolojilerine göre belirgin avantajlar sağlayan çok çeşitli özelliklere sahiptir (6, 7).

Öldürülmüş veya zayıflatılmış patojenik ajanları içeren patojenlere karşı elde edilen geleneksel aşılar karşın, DNA aşıları güvenli bulunmayan bulaşıcı ajanları içermez, patojenite riski taşımaz ve her kesime güvenle uygulanabilir. Ayrıca, DNA aşıları, adaptif bağışıklığın üç kolunu oluşturan; antikorlar, yardımcı T hücreleri (Th) ve sitotoksik T-lenfositler (CTL'ler) ve ayrıca doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini verimli bir şekilde aktive edebilirler (8). Son derece esnek genetik tasarımları ve basit yapıları nedeniyle DNA plazmidleri kısa sürede kolayca manipüle ve modifiye edilebilir. Bu durum, pandemik tehditlerin ortaya çıkmasına karşın aşı üretirken önemli bir kriterdir. DNA plazmid aşı vektörleri bakterilerde kolaylıkla kopyalanabildiği ve çoğaltılabildiği için DNA aşılarının ucuz ve önemli ölçüdeki üretimini de mümkün kılar. Diğer bir önemli avantaj ise DNA aşılarının oda sıcaklığında oldukça kararlı olmaları ve özel soğutma durumu gerektirmediklerinden kolayca saklanabilmeleri ve bu durum da onları gelişmekte olan ülkelerdeki kullanımı için çok pratik hale getirmektedir (9). Aynı zamanda, DNA aşıları son derece esnek ve viral/bakteriyel antijenler ve immünojenik/biyolojik proteinler de dahil olmak üzere tek bir yapıdaki birden fazla proteini kodlayabilir, güçlerini artırmak için adjuvan ekleme olasılığı ile multijenler veya multivalan aşılar oluşturabilirler (10,11). DNA aşılarının olumsuzlukları ise otoimmün bozukluklara neden olma olasılığı, antibiyotik direnç geninin transfer riski, immün adjuvanlara karşı oto antikor geliştirme olasılığı, yabancı DNA'nın konakçıya entegre olması nedeniyle insersiyonel mutajeneze yol açabilmeleridir (7).

1.2. DNA Aşılarının Tasarımı

DNA aşı tasarımındaki temel basamaklar (Şekil 1) kısaca aşağıdaki gibidir;

1. İlk olarak aşı çalışmasında kullanılacak olan hedef gen bölgesi seçilir ve restriksiyon enzimleri ile kesilerek istenilen genin izolasyonu sağlanır.
2. İzole edilen hedef gen daha önce belirlenmiş olan bir plazmide yerleştirilir.
3. Hedef geni taşıyan plazmid daha sonra alıcı bir hücreye aktararak çoğaltılır. Böylelikle çok fazla hücre bölünmesi ile özdeş konağın bir kolonisi üretilir.
4. Çoğaltılan plazmid DNA'ların izolasyonu sağlanır.
5. İzole edilen plazmid DNA'nın kalitatif ve semikantitatif olarak belirlenmesi için in vitro ekspresyonu yapılır.
6. Sonrasında elde edilen rekombinant aşının hayvan denemeleri ile immün yanıtları ve klinik durumları belirlenmeye çalışılır.
7. Rekombinant aşının tüm denemeleri olumlu sonuçlandığında ve patenti alındığında büyük ölçekli bir üretime gidilir.



Şekil 1. DNA aşı tasarımındaki temel basamaklar (Orjinal)

2. Parazitoloji Alanındaki DNA Aşı Çalışmaları

2.1. Fasciola spp.

Fasciola hepatica glutatyon S-transferaz'ı (GST) kodlayan DNA yapıları ile aşılamaı takiben farelerdeki humoral tepkiler değerlendirilmiş ve GST47 cDNA, ekspresyonu sırasıyla sitoplazmik ve hücre dışı bölümlere yönlendiren VR1012 ve VR1020 olmak üzere iki DNA aşı vektörüne klonlanmıştır. Neticede, Fasciola GST'ye dayalı bir DNA aşısının immünojenitesinin yanı sıra GST'ye karşı yanıtın izotipinin aşı uygulama modu tarafından belirlendiği gösterilmiş ve humoral immün yanıt elde edilmiştir (12). Kofta ve ark. (13), sistein proteinaz cDNA ile aşılanan erkek sıçanların, *F. hepatica* enfeksiyonuna karşı %100, dişi sıçanların ise %74 oranında korunduğunu belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada, hem *F. gigantica* yağ asidi bağlayıcı protein (FABP) hem de *F. hepatica* katepsin L5'in (FhCatL5) COS 7 hücrelerinde eksprese edildiği ve farelerde salgı yapıları olarak verildiğinde humoral bir tepkiyi indüklediği gösterilmiştir. Sonuçlar, Fasciola antijenlerinin DNA aşıları olarak kullanılabileceğini, ancak yanıtın kalitesinin antijenler arasında değiştiğini ve aşı verme yönteminden etkilendiğini göstermektedir (14). Wedrychowicz ve ark. (15), GST cDNA ile aşılanmış sıçanlarda %54 ve GST proteini ile aşılanmış grupta %48 oranında parazit yükünün azaldığını ortaya koymuşlardır. GST proteini ile aşılanmış grup, aşılamaı takiben net IgG1, IgG2a, IgG2b ve IgA tepkileri gösterirken, GST'nin cDNA'sı ile aşılanmış sıçanlarda enfeksiyondan sonraki günden sonra hiçbir spesifik antikor bulunmamıştır. Yine Wedrychowicz ve ark. (16), sistein proteinazını (CP) kodlayan cDNA (CPcDNA) ile intranasal, intramüsküler ve intraperitoneal olarak aşılanan sıçanların CPcDNA ile intranasal immünizasyonunun Th2 yanıtını, intramüsküler veya intraperitoneal enjeksiyonların ise hem Th1 hem de Th2'ye bağımlı antikorları uyardığını göstermişlerdir. Espino ve ark. (17), *F. hepatica* protein ailesinin saposin benzeri (FhSAP-2) yeni bir antijeninin DNA aşısı olarak verilebileceğini ve tek başına rekombinant proteinden daha güçlü bir Th1 tepkisini indüklediğini bildirmişlerdir. Espino ve ark. (18), başka bir çalışmalarında, cDNA-FhSAP2 ile aşılanmış farelerde bulunan ortalama parazit yükünün, kontrollere kıyasla %83.3, rekombinant protein ile aşılanmış farelerde ise %60 oranında azaldığını belirlemişlerdir. Tüm aşılanmış hayvanların, deneme kontrollerine göre daha az karaciğer hasarına sahip olduğu gözlenmiştir. Başka bir çalışmada ise, genç parazitler tarafından salgılanan önemli bir sistein proteaz olan Catepsin B (Cat B2)'nin bağışıklık tepkilerini artırmak için cDNA dizisi dört farklı DNA aşı vektörü ile kaynaştırılmıştır. DNA aşıları, yüksek Cat B2'ye özgü IgG, IgG1, IgE ve ayrıca orta düzeyde IgG2a antikor yanıtları ortaya çıkarırken, Cat B2'ye özgü IL-4 T hücre tepkileri, Cat B2 ile aşılanmış farelerde de gözlenmiştir (19).

2.2. Schistosoma spp.

Zhou ve ark. (20), Sjc97'yi kodlayan nükleik asidin, intramüsküler yoldan uygulandığında C57BL/6 farelerinde Th1 tipi bir bağışıklık tepkisini indükleyebildiğini ve koruyucu etkinlik sağlayabildiğini

göstermektedir. Zhang ve ark. (21), *S. japonicum*'u kodlayan dört DNA plazmidini içeren bir kokteyl DNA aşısı kullanarak fare aşılama deneyleri gerçekleştirmişlerdir. Kokteyl DNA aşısının üç intramüsküler enjeksiyonu, rekombinant antijenlerle in vitro stimülasyon üzerine splenositler tarafından yüksek düzeyde IFN- γ üretimi ile önemli bir Th1 hücresel tepkiyi indüklemiştir. Lei ve ark. (22), *S. japonicum*'un Sjtsp2 ve Sjt29 zar proteinlerini içeren yüksek performanslı iki değerlikli bir DNA aşısı üzerine çalışmışlardır. Uygulama sonucunda Sjtsp2, Sjt29 ve Sjtsp2-29 ile aşılamanın kontrol grubuna kıyasla parazit yükünü ve karaciğer patolojisini azalttığı ve bivalan Sjtsp2-29 DNA aşısının koruyucu etkisinin tek değerli Sjtsp2 veya Sjt29 DNA aşılarından daha iyi olduğunu göstermiştir. Frantz ve ark. (23), DNA-hsp65 aşısının fareleri Schistosoma yumurtalarının neden olduğu fibrozise karşı koruduğunu ve granülomların boyutunu azalttığını bildirmişlerdir. Chlichia ve ark. (24), DNA bazlı aşı teknolojisini, farelerde bir şistozom sistein proteinazı olan asparaginil endopeptidaza (Sm32) karşı bir bağışıklık tepkisini indüklemek için kullanmışlardır. Bu DNA aşısı, dişi parazitlerin üreme faaliyetleri üzerinde negatif bir etkiye yol açmıştır. Enfeksiyona maruz kalan dişi parazitler, saf farelerde büyüyenlere göre %37 daha az yumurta üretmiştir. Sonuçlar, Sm32'nin şistozomlara karşı bir anti-patoloji aşısının üretilmesi için aday antijen olabileceğini düşündürmüştür.

2.3. Taenia spp.

Taenia saginata'nın TSA-9 ve TSA-18 olarak adlandırılan iki antijeninin bir kombinasyonu ile aşılamanın, *T. saginata* ile deneysel enfeksiyona karşı %99.8'e kadar koruma sağladığı tespit edilmiştir (25). Guo ve ark. (26), iki farklı prime-boost rejiminde aşılanmış domuzlarda *T. solium*'a karşı koruma süresini araştırmışlardır. Sonuçlar, 6. ve 12. haftalarda enfekte edilip aşılanmış domuzların kist gelişiminde önemli azalma olduğunu göstermiştir. 20. haftada enfekte edildiğinde, DNA aşısı (pcDNA3-cC1) ve ardından protein aşısının iki güçlendiricisi (GST-cC1) ile aşılanan domuzlar, *T. solium* yumurtalarının tehdidine karşı önemli oranda korunurken, protein aşısının üç enjeksiyonunu alan domuzlar, aşılanmamış kontrollere kıyasla önemli bir koruma göstermemiştir. Drew ve ark. (27), üç farklı *T. ovis* konak koruyucu 45W, 18k ve 16k antijenlerini kodlayan DNA aşılarının immünojenitesini, fare ve koyunlarda karşılaştırmışlardır. 45W, 18k veya 16k antijeni eksprese eden DNA aşıları, farelerde immünojenik bulunmuş ve önemli spesifik antikor titreleri üretmiştir. Yetişkin koyunların DNA aşıları ile aşılanmaları neticesinde 45W'ye özgü antikor önemli ölçüde daha düşük düzeyde üretilirken, 18k veya 16k'ya özgü antikor üretimi olmamıştır.

2.4. Echinococcus granulosus

BALB/c farelerinde adjuvan olarak murin interlökin 12 (pcMIL12) ile birlikte aşı olarak *E. granulosus* antijen B (pcHyd1) içeren ekspresyon plazmidini pcDNA3.1'in kullanıldığı bir çalışmada, pcHyd1+pcMIL12 alan fareler, tek başına pcHyd1 alan farelere kıyasla daha yüksek seviyelerde lenfosit proliferasyonu sergilemiş ve diğer

gruplara kıyasla önemli ölçüde daha fazla IFN- γ üretmişlerdir. IgG2a seviyeleri, pcHyd1+pcMIL12 grubunda tek başına pcHyd1, boş plazmid ve PBS gruplarıyla karşılaştırıldığında açıkça daha yüksek bulunmuştur. Buna karşılık, pcHyd1 grubunda IgG1 yükselmiş ve IL-12'nin antijen B'nin 8 kDa alt birimini kodlayan DNA ile birlikte verilmesi, farelerde bağışıklık tepkisini indüklemeye önemli ölçüde etkili olmuştur (28).

2.5. Haemonchus contortus

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenazın (HcGAPDH) parazit fizyolojisindeki kritik işlevleri nedeniyle, *H. contortus*'ta aşı için potansiyel bir aday olabileceği düşünülmüş ve HcGAPDH antijenini ekspresye eden DNA aşısı, keçilerde deneysel *H. contortus* enfeksiyonlarına karşı koruma için test edilmiştir. DNA aşısı ile bağışıklamadan sonra, önemli ölçüde yüksek seviyelerde serum IgG, serum IgA, mukozal IgA, CD4+ T lenfositleri ve B lenfositleri üretildiği gözlenmiştir. Ayrıca aşılanan grupta kan eozinofillerinin sayısında artış ve hemoglobin seviyesinde düşüş gözlenmiştir (29).

2.6. Ancylostoma ceylanicum

Ancylostoma ceylanicum metalloproteaz 6'yı (Acemep-6) kodlayan bir cDNA klonlanıp, hamster grupları bu DNA aşısı ile bir veya üç kez aşılanmışlardır. Tek doz uygulanan hayvanlar enfeksiyona karşı yüksek direnç geliştirirken, üçlü bağışıklama parazit yükünde azalma ile sonuçlanmamıştır (30).

2.7. Strongyloides stercoralis

Kerepesi ve ark. (31), *S. stercoralis* larvalarından elde edilen, tropomyosin (Sstmy-1), Na⁺-K⁺ATPase (Sseat-6) ve LEC-5 (Sslec-5) antijenlerini kodlayan genleri, fare ve sıçanlara granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör içeren bir plazmid ile kombinasyon halinde intradermal olarak vermişlerdir. Sadece Na⁺-K⁺ATPase DNA ile bağışıklamadan sonra larva sayısında önemli bir azalma görülürken, Na⁺-K⁺ATPase dahil olmak üzere üç plazmidin tümünün bir kombinasyonu ile bağışıklama sonucu koruyucu bir bağışıklık indüklenmemiştir.

2.8. Ascaris suum

Ascaris suum enolaz'ını (As-enol-1) kodlayan gen bölgesi amplifiye edilip klonlanılmış, pVAX-Enol ile bağışıklanan farelerin, *A. suum*'a karşı yüksek düzeyde spesifik antikor tepkileri, güçlü bir lenfoproliferatif tepki ve önemli seviyelerde IFN- γ , IL-2, IL-4 ve IL-10 üretimi geliştirdiği gösterilmiştir (32).

2.9. Toxocara canis

pcDNA3-CpG aşısının *T. canis* enfeksiyonunu takiben kalıcı ama düşük seviyelerde kan/bronko alveolar eozinofiliye yol açtığı gösterilmiştir. Bu aşı aynı zamanda, düşük IgG1 seviyelerinin yanı sıra yüksek IFN- γ /IL-4 ve ardından yüksek IgG2a/IgG1 oranına yol açmıştır (33).

2.10. Brugia malayi

Li ve ark. (34), *B. malayi*'nin paramiyosin (BM5), ısı şoku proteini (BMHSP-70), ara filament (BMIF) ve bir serodiagnostik antijen (BM14) kodlayan 4 gen bölgesini ökaryotik ekspresyon vektörlerine (pJW4303 ve pCRTM3.1) yerleştirmişlerdir. BM5 paramiyosinine karşı antikor yanıtları, intradermal aşılamadan sonra daha düşük IgG2a ve IgG1 seviyeleri gösterirken, intramüsküler aşılama baskın IgG2a antikor yanıtları üretmiştir.

2.11. Onchocerca volvulus

Steisslinger ve ark. (35), bir DNA aşı adayı olarak *O. volvulus* gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenazı (Ov-GAPDH) değerlendirmişlerdir. DNA plazmidini içeren formülasyonlar, bağışık hayvanlarda erişkin parazit yüklerinde ve mikrofilaremiye %94'e kadar azalmaya yol açmıştır.

2.12. Trichinella spiralis

Trichinella spiralis Ts87 geni bir ekspresyon plazmidini olan pVAX1'e klonlanmıştır. Ts87 DNA'sı ile aşılanan farelerde lokal mukozal IgA tepkisi ve sistemik bir Th1/Th2 bağışıklık tepkisi ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, Ts87 DNA'sının, bir IgA tepkisi ve dengeli bir Th1/Th2 bağışıklık tepkisi ortaya çıkararak farelerde *T. spiralis* enfeksiyonuna karşı kısmi bir koruma sağladığı gösterilmiştir (36).

2.13. Trypanosoma spp.

Trypanosoma evansi beta (β) tubulin genini kodlayan bir DNA parçası, farelerde humoral bağışıklık tepkisini ortaya çıkarmak için kullanılmıştır. Bağışıklama sonrası, IFN- γ ve TNF- α seviyelerinde önemli bir artışla birlikte baskın bir T yardımcı hücre Tip 1 (Th1) tepkisi tespit edilmiştir (37). Limon-Flores ve ark. (38), *T. cruzi* enfeksiyonunun önlenmesi ve tedavisi amacıyla TSA-1 ve Tc24'ün bir kombinasyonunu kodlayan yeni bir DNA aşısını test etmişlerdir. Terapötik aşılama sonrası dalakta parazite özgü IFN- γ üreten CD4+ ve CD8+ T hücrelerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Silva ve ark. (39), *T. brucei* *brucei*'nin trans-sialidaz (nTSA) genini kodlayan bir plazmid DNA aşısı ile intramüsküler yolla bağışıklanan BALB/c farelerinin, IgG antikorları üretebildiğini ve *T. brucei* *brucei* ile enfekte edilmiş farelerin %60'ının korunduğunu göstermişlerdir.

2.14. Leishmania spp.

Ahmed ve ark. (40), *Leishmania major*'e ait LACK, PSA2, Gp63, LeIF ve p20 antijenlerinin BALB/c farelerindeki koruyucu etkilerini karşılaştırmışlardır. En iyi koruma, LACK DNA aşısı ile aşılanmış farelerde gözlenmiştir. Bununla birlikte, DNA aşısı adaylarının hiçbiri, *L. major* ile enfekte edilen BALB/c farelerinde tam bir koruma sağlayamamıştır. Aguilar-Be ve ark. (41), fucose-mannose ligand (FML), rekombinant nucleoside hidrolase 36 (rNH36) ve NH36 genlerini BALB/c farelerinde visseral (*L. chagasi*) ve kutanöz (*L. mexicana*) leishmaniasis etkenlerine karşı bağışıklık

tepkisini test etmişlerdir. Üç aşı grubunun tümü, *L. chagasi*'ye karşı yüksek IgG, IgG1 ve IgG2a seviyeleri göstermiştir. rNH36 veya FML ile immünize edilmiş farelerde ise *L. donovani* ve *L. mexicana* antijenlerine karşı güçlü bir intradermal reaksiyon görülmüştür. *L. chagasi* enfeksiyonuna karşı FML ve rNH36 antijenleri ile immünize edilmiş farelerde parazit yüklerinde %79'luk bir azalma tespit edilmiştir. En iyi koruma, NH36 DNA aşısı ile aşılanmış farelerde gözlenmiştir. Sonuç olarak, NH36 DNA aşısının viseral ve kutanöz leishmaniasis'e karşı güçlü bir immün korumayı indüklediği gösterilmiştir. Oliveira-da-Silva ve ark. (42), pyridoxal kinase (PK)'in bir DNA plazmidi (pDNAA3/PK) veya rekombinant protein (rPK) olarak uygulandığında şekillenen bağışıklık durumunu değerlendirmişlerdir. Her iki aşılama şeklinde de Th1 bağışıklık tepkilerindeki değişiklikler nedeniyle farelerde *L. infantum*'a karşı koruma sağlanmıştır.

2.15. Giardia lamblia

Giardia lamblia'dan tam uzunlukta bir kist duvarı proteini-2'yi (CWP2) kodlayan gen bölgesi klonlanmış ve *S. typhimurium*'a dahil edilmiştir. DNA aşısının uygulanması, Th1/Th2 tepkisi ile karakterize edilen CWP2'ye özgü hücrel bağışıklık tepkilerinin üretilmesine yol açmış, ELISA ile bağırsak salgılarında antijene özgü IgA ve IgG antikorları tespit edilmiştir. DNA aşısı uygulanan farelerden atılan kist oranında yaklaşık %60 oranında azalma olduğu görülmüştür (43).

2.16. Cryptosporidium spp.

Yu ve ark. (44), *Cryptosporidium parvum*'a karşı oluşturulan Cp12, Cp21, Cp12-Cp21 ve C [CpG oligodeoksineokleotid (ODN)]-Cp12-Cp21'in DNA dizilerini amplifiye etmişler ve daha sonra pVAX1 vektörüne klonlayarak dört rekombinant plazmid oluşturmuşlardır. Sonuç olarak, dört DNA aşısının uygulama sonrası, önemli antikor tepkileri ve spesifik hücrel tepkiler ortaya çıkardığını göstermişlerdir. Bu dört plazmid arasında, pVAX1-C-Cp12-Cp21, önemli ölçüde daha yüksek IgG seviyeleri ortaya çıkarmıştır. Sonuç olarak, pVAX1-C-Cp12-Cp21 nazal gruptaki farelerin ookist çıkarma seviyesinde %77.5'lik bir azalmaya sahip olduğu gösterilmiştir.

2.17. Eimeria spp.

Song ve ark. (45), *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. maxima* ve *E. acervulina*'ya karşı epitop DNA aşılarının tavuklar üzerindeki koruyucu etkilerini değerlendirmişlerdir. Yapılandırılmış bu çok değerli epitop DNA aşılarının, vücut ağırlığını önemli ölçüde artırdığı, enterik lezyonları hafiflettiği ve enfekte kanatlıların dışkıdaki ookist sayısını azalttığını tespit etmişlerdir.

2.18. Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii'ye karşı bağışıklığa CD8+ T hücreleri ve IFN- γ üretimi aracılık ediyor gibi görüldüğünden (46), bu aşılar sitotoksik bir bağışıklık tepkisinin güçlü aktivatörleri olduğu için DNA aşılması

toksoplazmoza karşı uygun bir bağışıklık kazandırma aracı olabilir. Bir dizi aday antijen, tek gen formülasyonlarında kullanılmış veya çok değerli DNA aşılarında birleştirilmiştir. Bu yapılar, toksoplazmoza karşı değişen derecelerde kısmi koruma sağlamıştır. Seçilen genler arasında, takizoit yüzeyinde bulunan en bol protein olan yüzey antijen ailesinin üyeleri bulunmaktadır (47). İyi taranan adaylardan oluşan ikinci bir grup, takizoitlerin vakuolünün ve bradzoitlerin kist duvarının önemli bir bileşeni olan yoğun granül antijen ailesine aittir (48). Önerilen diğer antijenler, mikronem (49) ve rhoptry proteinleri (50) gibi konakçı hücre istilasının teşvik edilmesinde rol oynayan proteinleri içermektedir. AMA1 (51), bradzoit antijen 1 (51) ve ısı şoku proteinleri HSP70 ve HSP30'un (52) immünolojik potansiyeli de değerlendirilmiştir.

2.19. Neospora caninum

Yu ve ark. (53), BALB/c farelerinde yoğun granül proteinleri 1 (GRA1), GRA4, GRA9, GRA14, GRA17 ve GRA23'ü kodlayan genlere sahip DNA aşılarının *N. caninum* takizoitlerine karşı oluşturduğu koruyucu bağışıklığı değerlendirmişlerdir. Bağışıklık tepkileri, serum antikor düzeylerinin izlenmesi, lenfosit proliferasyonunun ölçülmesi ve sitokinlerin salgılanması yoluyla değerlendirilmiştir. Sonuçlar, tüm DNA aşılarının, daha yüksek seviyelerde IgG ve IgG2a antikorları ve ayrıca artan Th1 tipi IFN- γ salgılanması ile dikkat çekici ölçüde spesifik humoral ve hücrel tepkileri tetikleyebileceğini göstermiştir.

2.20. Plasmodium spp.

DNA aşıları, tek gen formülasyonları olarak uygulanabildiği gibi aynı zamanda bir antijen kombinasyonu olarak da oluşturulabilir. Bu adaylar arasında sirkumsporozoid protein (CSP), exported protein 1 (EXP1), sporozoit yüzey proteini 2 (SSP2) ve karaciğer evresi antijenleri LSA1 ve LSA3 yer alır. Bu proteinler sporozoitlerin yüzeyinde bulunur ve bu nedenle eritrosit safhası öncesi, aşılarla kullanılabilir. Kan evresi aşıları, merozoit yüzey proteini 1 (MSP1), apikal membran antijeni 1 (AMA1) ve eritrosit bağlayıcı protein (EBA-175) gibi merozoitlerin yüzeyinde bulunan antijenlere dayanır. İnsanlarda test edilen en umut verici prototiplerden biri, aynı proteini kodlayan Modified vaccinia virus Ankara (MVA) ile birlikte uygulanan thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) antijenini kodlayan aşı prototipidir. Bu aşının kullanılması, deneysel enfeksiyonda paraziteminin başlamasını geciktirmiştir (54). Bu formülasyon ile antikorların üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Bu aday antijen *P. falciparum*'a karşı gelişmiş en iyi adaylardan biri olarak kabul edilir (55, 56). Bu aşının etkinliğini artırmaya yönelik stratejiler, MSP1 gibi antijenlerin kullanımı veya bir heterolog prime-boost kullanımı ile artırılabilir (57).

2.21. Babesia microti

Sistein proteaz 1 (CP1) ve Apikal Membran Antijen-1 (AMA-1) ile ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanarak DNA aşılarının koruyucu etkileri değerlendirilmiştir. Bu aşılar uygulandıktan sonra parazitin gelişiminde bir engel oluşturduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, aynı anda verilen iki yapının kombinasyonunun parazit ilerlemesi üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür (58).

2.22. Anaplasma spp.

Crosby ve ark. (59), rekombinant VirB9-1, VirB9-2 ve VirB10 ile fareleri aşılıyarak bağışıklık tepkilerini gözlemlemişlerdir. *Anaplasma phagocytophilum* Tıp 4 Salgı Sistemi (T4SS) VirB10'un bir murin modelinde IFN- γ 'ye bağlı bir şekilde enfeksiyona karşı kısmen koruyucu olduğuna dair kanıt sağlamıştır. Muhtemelen bir T4SS DNA aşısının diğer patojenik anaplasma türlerine karşı da potansiyel bir aşı adayı olabileceği öne sürülmüştür.

2.23. Ixodidae spp.

Klouwens ve ark. (60), bir kene ısırması enfeksiyon modelinde kene antijenlerinin etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Kene antijenleri olan TSLPI, Salp15, tHRF ve Tix-5'e karşı düşük ile orta IgG titreleri indüklenmiş, ancak tam bir koruma sağlanamamıştır. Bu nedenle, DNA aşısı, kene karşıtı aşılar için kene antijenlerini belirlemek veya taramak için uygun bir aşı stratejisi gibi görünmemektedir. Zhang ve ark. (61) tavşanlarda *Haemaphysalis longicornis* Paramiyosin'ini (Pmy) kodlayan rekombinant plazmidlerin sağladığı bağışıklık tepkisini değerlendirmişlerdir. Pmy ile aşılanan tavşanlar, kontrol grubuna kıyasla yüksek düzeyde IgG geliştirmiştir. DNA aşısı ile aşılama sonrası tavşanların immün korumasında genel olarak %50'lik bir etkinlik sağlanmıştır.

2.24. Varroa destructor

Giese ve ark. (62), bu amaçla arının bağışıklık sisteminin tam işlevini yeniden oluşturabilen DNA aşısı geliştirmişlerdir. Bu aşı biyolojik olarak güvenilen, iyi tolere edilebilen, yan etki göstermeyen ve çevreye herhangi bir kirlilik oluşturmayan özelliكتedir.

2.23. Sarcoptes scabiei

Sarcoptes scabiei Paramiyosin'ini (PAR) kodlayan gen bölgesi klonlanmış ve PAR-DNA aşısının farelerde karışık bir Th1/Th2 tepkisini indüklediği görülmüştür (63).

Kaynaklar

1. Battegay M, Mössner J, Parasitic diseases. Der Internist 2006; 47: 785-785.
2. Edwards G, Krishna S. Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of parasitic infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 233-42.

2.24. Hypoderma lineatum

Hypodermin C (HC) geni ökaryotik ekspresyon vektörü pVAX1'e klonlanmış, rekombinant plazmid pVAX1-HC, farelerin embriyonik fibroblastlarına (MEF) transfekte edilmiştir. Sonuç olarak serum antikor seviyelerinin ve lenfosit proliferasyon seviyelerinin kontrol grubundakinden önemli ölçüde daha yüksek olduğunu tespit edilmiştir (64).

Sonuç

Parazitoloji'de aşı alanında ilerleme olmaması esas olarak parazit yaşam döngüsünün karmaşıklığına bağlıdır. Parazitler, konakçı bağışıklık sisteminin etkisini karıştırmalarına izin veren birçok kaçış mekanizması geliştirmişlerdir. Bununla birlikte, DNA aşılama ortaya çıkışı, bu kısıtlamaların üstesinden gelmek için bir bağışıklama platformu sağlamıştır. Plazmid DNA, farklı yaşam evrelerinde bulunan veya parazitin farklı alt türlerine ait olan antijenleri aynı anda entegre edebilir. Bununla birlikte, bir immünojenik antijen kullanımı, konakçıda koruyucu bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarmak için tek başına yeterli olmayabilir. DNA aşıları, konağın enfeksiyona karşı immün yanıtından kaynaklanan immünoopatolojilere karşı koymak için tasarlandığında, terapötik yaklaşımlarda kullanım potansiyeline sahiptir. Çağdaş yaklaşımlarla karşılaştırıldığında, DNA aşı teknolojisi daha uygun maliyetli ve iyi karakterize edilmiş bir üretim süreci ile ilişkilidir ve aşının yaşayabilirliğini sürdürmek için bir soğuk zincirin varlığını gerektirmez. Test edilen aşı adaylarının çoğu, kısmi ve hatta tam koruyucu bağışıklık ile sonuçlanan paraziter hastalıkların oluşturduğu spesifik ve karmaşık zorlukları ele alma potansiyelini göstermiştir. Parazitlere yönelik DNA aşılarının geliştirilmesi, DNA bağışıklama protokolleri için oluşturulmuş optimizasyon stratejilerinin kullanımından da faydalanacak, yani daha iyi uygulama sistemleri ve adjuvanların yanı sıra daha etkili bağışıklama protokollerinin kullanımını gerektirecektir. Bu iki yaklaşım, klinik deneylerde artan sayıda aşı prototipinin değerlendirilmesi ile sonuçlanacak ve bu araştırma alanında hızlı ilerlemelere neden olacaktır.

Sonuç olarak, DNA aşıları üzerinde yapılacak olan yeni çalışmalar, mevcut aşılama yollarına alternatifler sunmaya, aşısı mevcut olmayan ve ekonomik açıdan önemli olan paraziter hastalıkların kontrolünü sağlayarak hayvansal üretimi arttırmaya, pet hayvanlarının sağlıklarını korumaya, aynı zamanda zoonoz paraziter hastalıkların önüne geçmeye ve son olarak yetersiz kalan mevcut aşılama yöntemlerinin ve daha da güçleştirilmesini sağlamaya olanak sağlayabilecektir.

3. Behr C, da Silva LHP, Vaccination against protozoa. In: Mehlhorn H. (Editor). Encyclopedia of Parasitology. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016.
4. Sharman PA, Smith NC, Wallach MG, Katrib M. Chasing the golden egg: Vaccination against poultry coccidiosis. Parasite Immunol 2010; 32: 590-8.

5. Ramaswamy K, Role of parasite vaccines in sustained animal health and production. *J Vet Parasitol* 2015; 29: 73-83.
6. Hobernik D, Bros M. DNA vaccines how far from clinical use? *Int J Mol Sci* 2018; 19: 3605.
7. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: Ready for prime time? *Nat Rev Genet* 2008; 9: 776-788.
8. Li S, MacLaughlin FC, Fewell JG, et al. Muscle-specific enhancement of gene expression by incorporation of SV40 enhancer in the expression plasmid. *Gene Ther* 2001; 8: 494-497.
9. Shedlock DJ, Weiner DB. DNA vaccination: Antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 793-806.
10. Williams JA, Carnes AE, Hodgson CP. Plasmid DNA vaccine vector design: Impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol Adv* 2009; 27: 353-370.
11. Capone S, Zampaglione I, Vitelli A, et al. Modulation of the immune response induced by gene electrotransfer of a hepatitis C virus DNA vaccine in nonhuman primates. *J Immunol* 2006; 177: 7462-7471.
12. Smooker PM, Steeper KR, Drew DR, Strugnell RA, Spithill TW. Humoral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*: effects of mode of vaccination and the cellular compartment of antigen expression. *Parasite Immunol* 1999; 21: 357-364.
13. Kofta W, Mieszczanek J, Plucienniczak G, Wędrychowicz H. Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. *Vaccine* 2000; 18: 2985-2990.
14. Smooker PM, Kennedy NJ, Steeper KR, Christopoulos H, Spithill TW. Fasciola: Kinetics and quality of humoral responses to fatty acid binding protein and cathepsin I following delivery as DNA vaccines in mice. *Exp Parasitol* 2001; 97: 154-160.
15. Wędrychowicz H, Szymanski P, Panasiuk LJ, Bienkowska-Szewczyk K. Humoral immune response of rats vaccinated with cDNA or protein form of glutathione-S-transferase of *Fasciola hepatica* to infection with metacercariae of the fluke. *Helminthologia* 2002; 39: 127-33.
16. Wędrychowicz H, Lamparska M, Kesik M, et al. The immune response of rats to vaccination with the cDNA or protein forms of the cysteine proteinase of *Fasciola hepatica*. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 94: 83-93.
17. Espino AM, Osuna A, Gil R, Hillyer GV. *Fasciola hepatica*: Humoral and cytokine responses to a member of the saposin-like protein family following delivery as a DNA vaccine in mice. *Exp Parasitol* 2005; 110: 374-383.
18. Espino AM, Morales A, Delgado B, et al. Partial immunity to *Fasciola hepatica* in mice after vaccination with FhSAP2 delivered as recombinant protein or DNA construct. *Ethn Dis* 2010; 20: S1.
19. Jayaraj R, Piedrafita D, Spithill T, Smooker P. Evaluation of the immune responses induced by four targeted DNA vaccines encoding the juvenile liver fluke antigen, cathepsin B in a mouse model. *Gen Vac Ther* 2012; 10: 1-9.
20. Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, et al. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasite Vector* 2013; 6:1-1.
21. Zhang Y, Taylor MG, Johansen MV, Bickle QD. Vaccination of mice with a cocktail DNA vaccine induces a Th1-type immune response and partial protection against *Schistosoma japonicum* infection. *Vaccine* 2001; 20: 724-730.
22. Lei N, Liu FC, Ren CP, Shen JJ, Liu M. An Efficient *Schistosoma japonicum* bivalent membrane protein antigen DNA vaccine against schistosomiasis in mice. *Med Sci Monit: Int Med J Exp Clin Res* 2019; 25: 9319.
23. Frantz FG, Ito T, Cavassani KA, et al. Therapeutic DNA vaccine reduces *schistosoma mansoni*-induced tissue damage through cytokine balance and decreased migration of myofibroblasts. *Am J Pathol* 2011; 179: 223-229.
24. Chlichlia K, Bahgat M, Ruppel A, Schirmacher V. DNA vaccination with asparaginyl endopeptidase (Sm32) from the parasite *Schistosoma mansoni*: Anti-fecundity effect induced in mice. *Vaccine* 2001; 20: 439-447.
25. Lightowers MW, Rolfe R, Gauci CG. *Taenia saginata*: Vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. *Exp Parasitol* 1996; 84: 330-338.
26. Guo YJ, Sun SH, Zhang Y, et al. Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine. *Vaccine* 2004; 22: 3841-3847.
27. Drew DR, Lightowers MW, Strugnell RA. A comparison of DNA vaccines expressing the 45W, 18k and 16k host-protective antigens of *Taenia ovis* in mice and sheep. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 76: 171-181.
28. Azizi H, Kazemi B, Bandehpour M, et al. Modulation of the immune response to DNA Vaccine encoding gene of 8-kda subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B using murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice. *Iranian J Parasitol* 2016; 11: 480.
29. Han K, Xu L, Yan R, Song X, Li X. Vaccination of goats with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase DNA vaccine induced partial protection against *Haemonchus contortus*. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 149: 177-185.
30. Wiśniewski M, Jaros S, Baška P, Cappello M, Wędrychowicz H. *Ancylostoma ceylanicum* metalloprotease 6 DNA vaccination induces partial protection against hookworm challenge infection. *Acta Parasitol* 2013; 58: 376-383.
31. Kerepesi LA, Keiser PB, Nolan TJ, et al. DNA immunization with Na⁺-K⁺ ATPase (Sseat-6) induces protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun* 2005; 73: 2298-2305.
32. Chen N, Yuan ZG, Xu MJ, et al. *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine* 2012; 30: 3478-3482.
33. Malheiro A, Aníbal FF, Martins-Filho OA, et al. pcDNA-IL-12 vaccination blocks eosinophilic inflammation but not airway hyperresponsiveness following murine *Toxocara canis* infection. *Vaccine* 2008; 26: 305-315.
34. Li BW, Rush A, Zhang SR, Curtis KC, Weil GJ. Antibody responses to *Brugia malayi* antigens induced by DNA vaccination. *Filaria Journal* 2004; 3: 1-8.
35. Steisslinger V, Korten S, Brattig NW, Erttmann KD. DNA vaccine encoding the moonlighting protein Onchocerca

- volvulus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Ov-GAPDH) leads to partial protection in a mouse model of human filariasis. *Vaccine* 2015; 33: 5861-5867.
36. Yang Y, Zhang Z, Yang J, et al. Oral vaccination with Ts87 DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* elicits a protective immune response against *Trichinella spiralis* larval challenge. *Vaccine* 2010; 28: 2735-2742.
 37. Kurup SP, Tewari AK. Induction of protective immune response in mice by a DNA vaccine encoding *Trypanosoma evansi* beta tubulin gene. *Vet Parasitol* 2012; 187: 9-16.
 38. Limon-Flores AY, Cervera-Cetina R, Tzec-Arjona JL, et al. Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: Role of CD4+ and CD8+ T cells. *Vaccine* 2010; 28: 7414-7419.
 39. Silva MS, Prazeres DM, Lança A, Atouguia J, Monteiro GA. Trans-sialidase from *Trypanosoma brucei* as a potential target for DNA vaccine development against African trypanosomiasis. *Parasitol Res* 2009; 105: 1223-1229.
 40. Ahmed SB, Bahloul C, Robbana C, Askri S, Dellagi K. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine* 2004; 22: 1631-1639.
 41. Aguilar-Be I, da Silva Zardo R, Paraguai de Souza E, et al. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect Immun* 2005; 73: 812-9.
 42. Oliveira-da-Silva JA, Lage DP, Ramos FF, et al. *Leishmania infantum* pyridoxal kinase evaluated in a recombinant protein and DNA vaccine to protects against visceral leishmaniasis. *Mol Immunol* 2020; 124: 161-171.
 43. Abdul-Wahid A, Faubert G. Mucosal delivery of a transmission-blocking DNA vaccine encoding *Giardia lamblia* CWP2 by *Salmonella typhimurium* bacteriofection vehicle. *Vaccine* 2007; 25: 8372-8383.
 44. Yu Q, Li J, Zhang X, et al. Induction of immune responses in mice by a DNA vaccine encoding *Cryptosporidium parvum* Cp12 and Cp21 and its effect against homologous oocyst challenge. *Vet Parasitol* 2010; 172: 1-7.
 45. Song X, Ren Z, Yan R, Xu L, Li X. Induction of protective immunity against *Eimeria tenella*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina* infections using multivalent epitope DNA vaccines. *Vaccine* 2015; 33: 2764-2770.
 46. Scorza T, D'souza S, Laloup M, et al. A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8+ T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* 2003; 71: 309-316.
 47. Liu S, Shi L, Cheng YB, et al. Evaluation of protective effect of multi-epitope DNA vaccine encoding six antigen segments of *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasitol Res* 2009; 105: 267-274.
 48. Cesbron-Delauw MF. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: Their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today* 1994; 10: 293-296.
 49. Ismael AB, Hedhli D, C r de O, et al. Further analysis of protection induced by the MIC3 DNA vaccine against *T. gondii*: CD4 and CD8 T cells are the major effectors of the MIC3 DNA vaccine-induced protection, both Lectin-like and EGF-like domains of MIC3 conferred protection. *Vaccine* 2009; 27: 2959-2966.
 50. Cong H, Gu QM, Yin HE, et al. Multi-epitope DNA vaccine linked to the A2/B subunit of cholera toxin protect mice against *Toxoplasma gondii*. *Vaccine* 2008; 26: 3913-3921.
 51. Dauti G, Munyaka B, Carmen G, et al. *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with genes encoding antigens MIC2, M2AP, AMA1 and BAG1 and evaluation of their immunogenic potential. *Exp Parasitol* 2007; 116: 273-282.
 52. Mohamed RM, Aosai F, Chen M, et al. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. *Vaccine* 2003; 21: 2852-2861.
 53. Yu G, Liang W, Yang Q, et al. Immune protective evaluation elicited by DNA vaccination with *Neospora caninum* dense granules proteins in mice. *Front Vet Sci* 2021; 8: 42.
 54. McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS, et al. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat Med* 2003; 9: 729-735.
 55. Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, et al. Efficacy of RTS, S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: A randomised trial. *The Lancet* 2001; 358: 1927-1934.
 56. Stoute JA, Kester KE, Krzych U, et al. Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS, S malaria vaccine. *J Infect Dis* 1998; 178: 1139-1144.
 57. Ballou WR. The development of the RTS, S malaria vaccine candidate: challenges and lessons. *Parasit Immunol* 2009; 31: 492-500.
 58. Carroll JE. *Babesia microti* Recombinant DNA Vaccine as a Model for *Babesia bovis* Prevention (PhD dissertation, Texas A & M University), 2011.
 59. Crosby FL, Lundgren AM, Hoffman C, Pascual DW, Barbet AF. VirB10 vaccination for protection against *Anaplasma phagocytophilum*. *BMC Microbiol* 2018; 18: 1-2.
 60. Klouwens MJ, Trentelman JJ, Wagemakers A, et al. Tick-tattoo: DNA vaccination against *B. burgdorferi* or *Ixodes scapularis* tick proteins. *Front Immunol* 2021; 12.
 61. Zhang TT, Zhang JC, Cui XJ, et al. Evaluation of immune protection induced by DNA vaccines from *Haemaphysalis longicornis* paramyosin in rabbits. *Parasit Vectors* 2017; 10: 1-6.
 62. Giese S, Giese M. Oral Vaccination of Honeybees Against *Varroa destructor*. *Mol Vaccines*. Springer 2013; 269-278.
 63. Gu X, Xie Y, Wang S, Peng X, Lai S, Yang G. Immune response induced by candidate *Sarcoptes scabiei* var. cuniculi DNA vaccine encoding paramyosin in mice. *Exp Appl Acar* 2014; 63: 401-412.
 64. Bai HY, Liu CX, Huhe B, Wang WL. Construction of *Hypoderma lineatum* Hypodermin C gene eukaryotic expression plasmid and immune tests in mice. *Progress Vet Med* 2012: 08.