

PENGEMBANGAN VAKSIN REKOMBINAN MENGGUNAKAN *HERPESVIRUS OF TURKEY* (HVT) SEBAGAI VEKTOR UNTUK BEBERAPA PENYAKIT VIRUS PADA INDUSTRI PERUNGGSAN

RISZA HARTAWAN

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114

(Makalah diterima 4 Januari 2011 – 3 Maret 2011)

ABSTRAK

Selama bertahun-tahun *Herpesvirus of Turkey* (HVT) telah digunakan sebagai vaksin hidup dalam pengendalian penyakit Marek's dalam industri perunggsan. Namun sesungguhnya potensi HVT tidak hanya terbatas pada penyakit Marek's semata. Dengan adanya teknik rekombinan, HVT yang secara alami bersifat tidak patogen memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai vektor vaksin untuk mengekspresikan antigen penting dari beberapa patogen berbahaya. Beberapa penelitian tentang vaksin rekombinan HVT telah dilakukan dengan cara menyisipkan gen penyandi antigen penting dari beberapa virus ke dalam genom dari HVT, seperti virus Marek's (MDV), virus Gumboro (IBDV), virus Newcastle disease (NDV) dan virus Avian Influenza (AIV). Adanya kemajuan teknologi rekombinan yang signifikan diharapkan mampu meningkatkan performa dari vaksin rekombinan HVT di masa mendatang.

Kata kunci: *Herpesvirus of turkey*, vektor vaksin, patogen virus

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF RECOMBINANT VACCINE USING *HERPESVIRUS OF TURKEY* (HVT) AS VECTOR FOR SEVERAL VIRAL DISEASES IN POULTRY INDUSTRY

Herpesvirus of turkey (HVT) has been utilised as live vaccine against Marek's disease in poultry industry world-wide for many years. However, the potency of HVT is not limited on the Marek's disease only. Along with rapid development of recombinant technique, the potency of HVT can be broaden for other diseases. As naturally apathogenic virus, HVT is a suitable candidate as vector vaccine to express important antigens of viral pathogens. Several researches have been dedicated to design HVT recombinant vaccine by inserting gene of important virus, such as Marek's disease virus (MDV), immuno bursal disease virus (IBDV), Newcastle disease virus (NDV) and Avian Influenza virus (AIV). Therefore, the future recombinant of HVT has been expected to be better in performance along with the improvement of recombinant technique.

Key words: *Herpesvirus of turkey*, live vector vaccine, viral pathogens

PENDAHULUAN

Herpesvirus of turkey (HVT) merupakan virus DNA dari genus Mardivirus yang secara alami bersifat tidak patogen, baik pada kalkun (induk semang utamanya) maupun pada spesies lain seperti ayam (FABRICANT et al., 1982). Secara taksonomi, HVT mempunyai hubungan erat dengan anggota genus Mardivirus lainnya, yaitu Marek's disease virus (MDV) dan Gallid herpesvirus 3 (GaHV3) (GIBBS et al., 1984). Jika GaHV3 bersifat tidak patogen sama seperti HVT, sebaliknya MDV sangat patogen dan menjadi agen penyebab penyakit Marek's (OSTERRIEDER dan VAUTHEROT, 2004). Proteksi silang diantara ketiga serotipe tersebut adalah alasan penggunaan HVT sebagai vaksin hidup untuk pengendalian penyakit Marek's dalam industri perunggsan komersial terutama pada peternakan *layer* dan *breeding* (BUBL

OT dan SHARMA, 2004). Namun peranan HVT sebagai vaksin tidak hanya terbatas hanya sebagai vaksin Marek's semata, potensinya dapat lebih diperluas untuk beberapa patogen penting lainnya.

Sebagai virus DNA dengan ukuran genom yang besar dan secara alami tidak patogen (AFONSO et al., 2001; KINGHAM et al., 2001). HVT berpotensi sebagai vektor dalam pengembangan vaksin rekombinan. Selama beberapa dasawarsa terakhir, telah bermunculan beberapa penelitian untuk pengembangan vaksin rekombinan dengan memanfaatkan HVT sebagai vektor untuk menghadapi beberapa virus patogen seperti Marek's (ROSS, 1998; ROSS et al., 1993), Gumboro (BUBLOT et al., 2007; DARTEIL et al., 1995), Newcastle disease (MORGAN et al., 1992; REDDY et al., 1996) dan Avian Influenza (LAN et al., 2009). Terlebih dengan adanya pengembangan teknik rekombinan yang baru, misalnya penggunaan *bacterial*

artificial chromosom (BAC) (BRUNE *et al.*, 2000) maka potensi pengembangan vaksin rekombinan HVT yang lebih efektif lebih terbuka lebar. Dalam penulisan artikel ini, penulis bertujuan untuk melakukan kajian pustaka mengenai aspek biologi HVT dan mencoba menelaah beberapa penelitian yang telah dilakukan dalam pengembangan HVT sebagai vaksin rekombinan untuk beberapa penyakit penting di peternakan unggas.

KARAKTER BIOLOGI *HERPESVIRUS OF TURKEY*

Taksonomi *herpesvirus of turkey*

Herpesvirus of turkey atau disebut juga sebagai turkey herpesvirus mempunyai nama lain yaitu Meleagrid herpesvirus 1 (MeHV1) (FAUQUET *et al.*, 2005). Virus ini pertama kali diisolasi oleh KAWAMURA *et al.* (1969) dari *turkey kidney cell culture*. Secara taksonomi, HVT dikelompokkan ke dalam genus Mardivirus dari subfamily *Alphaherpesvirinae* (DAVISON, 2010; FAUQUET *et al.*, 2005). Anggota Mardivirus yang lainnya adalah Marek's disease virus tipe 1 (MDV-1)/Gallid herpesvirus 2 (GaHV-2), Marek's disease virus tipe 2 (MDV-2)/Gallid herpesvirus 3 (GaHV-3) dan Pigeon herpesvirus/Columbid herpesvirus 1 (CoHV1) (DAVISON, 2010).

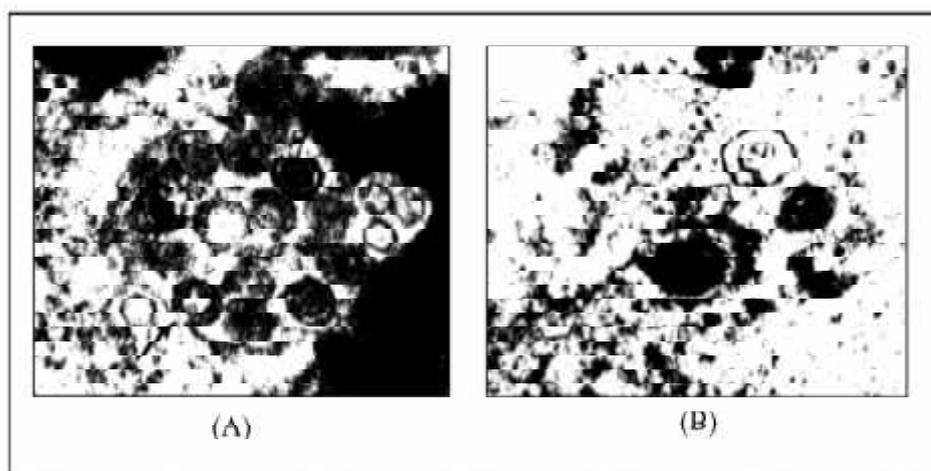
Dengan pengecualian CoHV1, serotiping Mardivirus masih mengadopsi penggunaan istilah MDV-1, MDV-2 dan HVT karena dekatnya hubungan diantara ketiga virus tersebut (BIGGS, 2001). Namun OSTERRIEDER dan VAUTHEROT (2004) mengkritisi penggunaan sistem tersebut karena ketiga virus tersebut sangat berbeda jauh, baik secara fenotipe maupun

genotipe. Kedua penulis tersebut memberikan alternatif penamaan lebih sesuai yaitu MDV, GaHV-3 dan HVT. Istilah MDV hanya dipergunakan untuk MDV-1 yang bersifat patogen, istilah GaHV-3 untuk alternatif penamaan MDV-2 sedangkan istilah HVT tetap dipertahankan.

Morfologi *herpesvirus of turkey*

Morfologi Mardivirus (HVT, MDV & GaHV-3) merupakan tipikal kelompok Herpesvirus (BIGGS, 2001; NAZERIAN *et al.*, 1971). Secara umum, morfologi Herpesvirus dibagi dalam dua komponen utama yaitu bagian dalam dan bagian luar. Komponen bagian dalam merupakan kapsid berbentuk ikosahedral yang mengandung materi genetik, sedangkan komponen bagian luar merupakan amplop virus yang terbentuk dari dua lapisan lemak yang dikelilingi *tegument* yang berbentuk tidak beraturan (FAUQUET *et al.*, 2005).

Sejumlah penelitian mengenai ukuran partikel HVT dengan mikroskop elektron memberikan hasil yang berbeda (CALNEK *et al.*, 1970; KAWAMURA *et al.*, 1969; NAZERIAN *et al.*, 1971). Namun hasil penelitian tersebut mengkonfirmasi kemiripan nukleokapsid yang berbentuk *hexagonal* dengan diameter 85-100 nm. Nukleokapsid tersebut dibentuk oleh rangkaian 162 partikel kecil (*hollow capsomer*) dengan ukuran 9-12 nm. Sementara itu, amplop virus yang terbungkus oleh *tegument* dengan ukuran bervariasi antara 120 – 400 nm tergantung dari tahap maturasi virion (CALNEK *et al.*, 1970; KAWAMURA *et al.*, 1969). NAZERIAN *et al.* (1971) menemukan fakta bahwa saat menginfeksi sel, virion lebih banyak teramati sebagai badan inklusi di dalam nukleus daripada di sitoplasma (Gambar 1).



Gambar 1. Bentuk virion dari HVT strain FC 126 dengan mikroskop elektron (pembesaran 66.000 kali): (A) virion yang teramati di daerah nukleus sel, (B) partikel virus lengkap dengan amplop di bagian retikulum endoplasma (sitoplasma)

Sumber: OKADA *et al.* (1972)

Genom herpesvirus of turkey

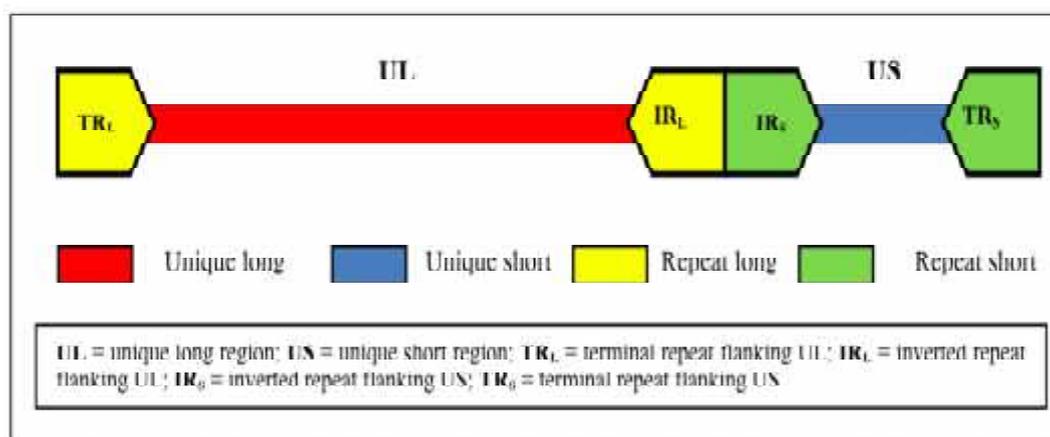
Genom HVT berbentuk *linear double stranded* DNA yang merupakan karakteristik dari kelompok *Alphaherpesvirus* (FAUQUET *et al.*, 2005; NAZERIAN *et al.*, 1971). Struktur genom Mardivirus diklasifikasikan sebagai tipe E (Gambar 2). Genom tipe E *Alphaherpesvirus* dicirikan dengan adanya *unique region* yang terbagi menjadi dua bagian utama yaitu *unique long* (UL) dan *unique short* (US) yang dibatasi oleh dua *inverted internal* (IR_L, IR_S), sedangkan pada bagian ujung dari UL maupun US diapit oleh dua bagian *terminal repeat* (TR_L, TR_S) (HOLLAND *et al.*, 1998; OSTERRIEDER dan VAUTHEROT, 2004). Bagian *repeat region* (TR_L&IR_L dan IR_S&TR_S) mempunyai sekuen gen yang identik namun tersusun dari arah yang berlawanan (AFONSO *et al.*, 2001; OSTERRIEDER and VAUTHEROT, 2004).

Studi komperhensif mengenai genom HVT *strain* FC 126 telah dilakukan oleh dua kelompok peneliti yaitu AFONSO *et al.* (2001) dan KINGHAM *et al.* (2001). Ternyata hasil kedua penelitian tersebut menunjukkan kemiripan untuk penyusunan peta materi genetik HVT. Kelompok peneliti pertama berhasil mengidentifikasi keseluruhan genom HVT sepanjang 159.160 *base pair* (bp) yang terdiri dari 111.868 bp, 8.617 bp, 5.658 bp dan 13.303 bp untuk bagian UL, US, RL (TR_L & IR_L), dan RS (IR_S & TR_S). Sementara itu, kelompok peneliti kedua mengidentifikasi 160.673 bp sebagai keseluruhan genom HVT yang terdiri atas 110.694 bp, 8.615 bp, 7.072 bp, 13.303 bp untuk bagian UL, US, RL (TR_L & IR_L), dan RS (IR_S & TR_S). Kedua penelitian tersebut mengkonfirmasi adanya defisiensi untuk gen-gen penyandi faktor virulensi pada genom HVT seperti

pada MDV yaitu *oncoprotein* MEQ, *CxC chemokine*, *oncogenicity-associated phosphoprotein* pp24 dan *phosphoprotein* pp38.

Patogenesis herpesvirus of turkey

Perjalanan infeksi HVT di induk semang tidak banyak dipelajari, namun patogenesisnya diperkirakan memiliki kemiripan dengan infeksi MDV (BAIGENT dan DAVIDSON, 2004; FABRICANT *et al.*, 1982; HOLLAND *et al.*, 1998). Infeksi virus Marek's terbagi dalam 3 tahapan utama yaitu infeksi produktif, infeksi laten dan transformasi (CALNEK dan WITTER, 1991; NAIR *et al.*, 2008). Infeksi awal dimulai dengan replikasi virus pada saluran pernafasan karena inhalasi debu atau rontokan epitel bulu yang mengandung partikel virus. Kemudian tahap infeksi produktif, virus Marek's umumnya bereplikasi secara sitolitik di sel (selain limfosit) yang ditandai dengan pembentukan *intranuclear inclusion body*. Partikel virus lengkap dengan amplop terbentuk pada jaringan epitel folikel bulu. Pada tahap infeksi laten, MDV umumnya menginfeksi limfosit T namun tidak menunjukkan adanya ekspresi dari virus. Diduga terjadi integrasi antara DNA virus dengan genom induk semang. Tahap transformasi terjadi karena adanya ekspresi dari gen MDV terhadap limfosit T yang menyebabkan terbentuknya *lymphoma*. Sementara itu, infeksi HVT menunjukkan kemiripan dalam beberapa aspek, seperti mampu bereplikasi di semua organ *lymphoid*, mempunyai periode laten serta infeksi persisten sebagai bentuk pertahanan terhadap sistem kekebalan induk semang.



Gambar 2. Diagram sistematik materi genetik dari HVT yang diklasifikasikan sebagai tipe E dari subfamili *Alphaherpesviridae*

Sumber: AFONSO *et al.* (2001); OSTERRIDER dan VAUTHEROT (2004)

Perbedaan mendasar antara infeksi HVT dan MDV adalah pada gejala klinis dan patologi yang dihasilkan (HOLLAND *et al.*, 1998). Jika infeksi MDV pada induk semang menyebabkan kerusakan sel pada organ secara sistemik dan menginduksi pembentukan tumor *lymphoma*, maka infeksi HVT sama sekali tidak menyebabkan kerusakan pada induk semang atau hanya sedikit kerusakan pada jaringan syaraf dan reproduksi (FABRICANT *et al.*, 1982; WITTER *et al.*, 1976).

Selain itu, metode penyebaran infeksi diantara keduanya juga sangat berbeda. Dalam perjalanan infeksi pada induk semang, virus Marek's jarang sekali ditemukan bebas di luar sel (bersifat *cell associated*). Tetapi virus Marek's ditemukan dalam konsentrasi tinggi dalam bentuk bebas dari sel pada jaringan epitel folikel bulu. Virus Marek's di folikel bulu mempunyai ketahanan yang luar biasa di lingkungan dan menjadi sumber penularan penyakit secara horizontal diantara induk semang (BAIGENT *et al.*, 2006; CALNEK, 2001; CALNEK *et al.*, 1970). Sebaliknya HVT yang sering ditemukan dalam keadaan bebas dari sel, namun hanya ditemukan dengan konsentrasi rendah pada epitel folikel bulu sehingga kemungkinan transmisi penyakit sangat rendah (FABRICANT *et al.*, 1982; NAZERIAN dan WITTER, 1970).

PENGEMBANGAN *HERPESVIRUS OF TURKEY* SEBAGAI VAKSIN REKOMBINAN TERHADAP BEBERAPA PATOGEN PENTING

Potensi HVT sebagai vektor vaksin rekombinan

Sebagai virus DNA dengan ukuran genom yang besar dan secara alami tidak patogen, HVT mempunyai potensi besar untuk dikembangkan sebagai vektor untuk mengekspresikan antigen dari virus lainnya. Beberapa faktor pendukung penggunaan HVT sebagai vektor vaksin rekombinan, adalah: (1) bersifat stabil secara molekuler karena mempunyai ukuran genomnya yang besar ditambah sehingga kapasitas insersinya juga besar (HIRAI dan SAKAGUCHI, 2001), (2) mampu menginduksi imunitas untuk jangka waktu yang panjang (SONDERMEIJER *et al.*, 1993), (3) tidak ada interferensi dengan maternal antibodi (MORGAN *et al.*, 1993; ROSS, 1998), (4) keterbatasan induk semang pada ayam dan kalkun sehingga mengurangi kemungkinan adanya transmisi antara spesies yang berbeda (*interspecies*) (HIRAI dan SAKAGUCHI, 2001), (5) keterbatasan laju transmisi horizontal sehingga mengurangi penyebaran ke lingkungan secara alami (FABRICANT *et al.*, 1982; NAZERIAN dan WITTER, 1970), (6) tersedianya teknik mutagenesis terbaru seperti teknologi *bacterial artificial chromosome* (BAC) untuk mendukung pengembangan HVT sebagai vaksin rekombinan (BAIGENT *et al.*, 2006).

Selain beberapa faktor di atas, HVT telah lama diaplikasikan sebagai vaksin hidup untuk penanggulangan penyakit Marek's di industri perunggasan (SONDERMEIJER *et al.*, 1993). Dengan potensi yang dimiliki oleh HVT dan teknik rekombinan yang telah tersedia maka kemampuan HVT sebagai vaksin dapat diperluas lagi, bukan hanya untuk penyakit Marek's saja tetapi juga terhadap penyakit-penyakit unggas strategis lainnya.

Pengembangan vaksin rekombinan HVT terhadap penyakit Marek's

Penyakit Marek's disebabkan oleh *Marek's disease virus* (MDV) dari genus *Mardivirus*, subfamili *Alphaherpesviridae* (BIGGS, 2001). Menurut NAIR *et al.* (2008), penyakit ini bisa menyerang ayam berumur 3 – 4 minggu tetapi lebih sering pada umur 12-30 minggu. Penyakit ini ditandai dengan pembentukan tumor yang bersifat progresif pada seluruh organ sehingga gejala klinis yang sering teramati adalah gejala syaraf berupa kelumpuhan sebagian atau total. Kelumpuhan yang terjadi tergantung daerah syaraf yang terganggu, namun gejala yang paling khas adalah kelumpuhan dengan satu kaki ke depan dan kaki yang lain ke belakang. Morbiditas dan mortalitas penyakit sangat tergantung pada patogenitas strain virus yang menginfeksi. Penyakit ini sangat merugikan dari sisi ekonomi karena dapat menyebabkan kegagalan siklus produksi akibat pengafkiran.

Metode penyebaran penyakit Marek's ke lingkungan adalah melalui rontokan epitel kulit dan folikel bulu (BAIGENT dan DAVIDSON, 2004). Agen penyakit yang berada di epitel kulit dan folikel bulu sangat tahan di lingkungan sehingga agen penyakit bersifat persisten di lingkungan. Hal ini menyebabkan program vaksinasi menjadi kebutuhan penting dalam industri unggas komersial terutama untuk layer dan breeding (BUBLLOT dan SHARMA, 2004). Tiga macam *master seed* vaksin yang digunakan adalah HVT, GaHV-3 dan *attenuated* MDV yang diaplikasikan secara massal di unit penetasan (*hatchery*) di pembibitan baik dengan metode *in ovo* pada umur 18 hari atau secara sub-kutan pada saat menetas (BUBLLOT dan SHARMA, 2004; NAIR, 2005).

Diantara ketiga jenis vaksin tersebut, HVT merupakan yang paling banyak digunakan karena sifatnya yang *apathogenic* dan kemampuannya untuk menginduksi kekebalan host terhadap infeksi penyakit Marek's untuk periode waktu yang panjang (BUBLLOT dan SHARMA, 2004; OKAZAKI *et al.*, 1970). Selain hal tersebut, vaksin HVT dapat diproduksi dalam bentuk kering (*lyophilized vaccine*) sehingga lebih mempermudah penanganan dan aplikasi di lapangan (BUBLLOT dan SHARMA, 2004). Terlebih lagi penggunaan HVT dapat diaplikasikan baik sebagai

vaksin tunggal ataupun dikombinasikan dengan dua jenis vaksin lainnya (BUBLOT dan SHARMA, 2004; HIRAI dan SAKAGUCHI, 2001).

Walaupun penggunaan vaksin Marek's berhasil menekan tingkat kejadian penyakit selama bertahun-tahun, namun sebenarnya permasalahan tidak berhenti begitu saja (GIMENO, 2008). Vaksin Marek's yang ada dianggap tidak mampu menginduksi kekebalan yang sempurna terhadap infeksi penyakit (*sterile immunity*) dimana vaksinasi hanya mampu mencegah timbulnya gejala klinis saja dan beberapa *strain* virus masih mampu bertahan dan bereplikasi di induk semang yang telah divaksinasi. Akibatnya virus mampu melanjutkan siklus infeksi dan terus menkontaminasi lingkungan (NAIR, 2005). Hal ini memicu perubahan virus menjadi lebih patogen untuk mengimbangi sistem kekebalan induk semang yang telah ditingkatkan oleh penerapan sistem vaksinasi (GIMENO, 2008).

Evolusi virus Marek's yang dipicu oleh adanya program vaksinasi tercerminkan pada peningkatan patogenitas virus dari bentuk *mild* klasik menjadi bentuk yang sangat patogen (WITTER, 1998). Hal ini dibuktikan dengan penelitian oleh WITTER (1997) yang membagi 31 isolat virus Marek's dalam tiga kelompok virus berdasarkan tingkat patogenitasnya yaitu *virulent* (v), *very virulent* (vv) dan *very virulent plus* (vv+). Evolusi virus tentu saja menjadi dilema untuk program pengendalian penyakit karena sebagai imbasnya diperlukan vaksin baru yang mampu mengatasi *strain-strain* yang baru bermunculan.

Beberapa alternatif telah dicoba untuk merancang vaksin baru. Alternatif pertama adalah dengan mencari *seed* vaksin baru yang lebih efektif dalam menghadapi *strain* yang ada pada saat seperti *attenuated* MDV *strain* CV1988/Rispen yang merupakan *master seed* vaksin terbaik untuk saat ini (GIMENO, 2008; KREAGER, 1998). Sedangkan alternatif lainnya adalah dengan memodifikasi vaksin yang ada seperti HVT ataupun GaHV-3 menggunakan teknologi rekombinan. ROSS *et al.* (1993) menyisipkan gen penyandi glikoprotein B (gB1) dari MDV ke dalam genom HVT pada lokus US2 yang menyandi thymidine kinase (TK) yang dengan menggunakan teknologi transfer plasmid. Mutan HVT yang mengandung gB1 (MDV) menunjukkan kemiripan secara biologi dengan *wild-type* HVT, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Mutan HVT tersebut tidak menimbulkan kerusakan pada organ sehingga aman untuk dipergunakan sebagai vaksin hidup. Uji tantang pada ayam *layer* menunjukkan bahwa vaksin rekombinan rHVT-gB1 memberikan tingkat proteksi yang lebih terhadap *strain* yang sangat patogen dari MDV dibandingkan dengan vaksin *wild-type* HVT (ROSS, 1998; ROSS *et al.*, 1996).

Penggunaan teknologi antiviral terbaru dengan aplikasi RNA *interference* (RNAi) juga diuji-cobakan untuk meningkatkan efikasi vaksin HVT dalam

menghadapi penyakit Marek's. CHEN *et al.* (2008) merancang beberapa *short-hairpin* RNA (shRNA) dengan target gen gB (MDV) yang berhasil menurunkan titer virus dan menyebabkan pengecilan ukuran *plaque* virus secara *in vitro*. Kemudian LAMBETH *et al.* (2009) berhasil membuat rekombinan HVT yang mengekskspresikan shRNA dengan target gen gB dan UL29 (MDV) pada HVT-BAC dalam sistem *Escherichia coli* strain DH10B. Walaupun tingkat proteksi dari rekombinan HVT tersebut (rHVT-shRNA(gB & UL29)) masih sama dengan tetua HVT, tetapi secara *in vivo* mampu menurunkan secara titer virus di sampel darah maupun folikel bulu. Aplikasi teknik antiviral dengan menggunakan RNAi pada HVT diharapkan mampu mempersulit evolusi MDV menjadi lebih ganas sebagai akibat tekanan kekebalan induk semang (*escape mutation*).

Pengembangan vaksin rekombinan HVT untuk penyakit Gumboro

Penyakit Gumboro merupakan penyakit akut dan sangat kontagius yang biasa menyerang ayam pada umur muda (3 – 6 minggu) yang disebabkan oleh *infectious bursal disease* virus (IBDV) dari genus Avibirnavirus (famili *Birnaviridae*) (FAUQUET *et al.*, 2005). Agen penyakit ini mempunyai genom *double stranded* RNA (dsRNA) yang terbagi menjadi 2 bagian yaitu segmen A dan segmen B. Segment A mengkode tiga protein penting yaitu *viral protein 2* (VP2), *viral protein 3* (VP3) dan *viral protein 4* (VP4), sedangkan segmen B mengkode *viral protein 1* (VP1). Virus Gumboro terbagi menjadi 2 serotipe. Jika serotipe 2 bersifat tidak patogen, maka serotipe 1 mempunyai *strain* yang bervariasi dari yang tidak patogen sampai dengan yang sangat patogen.

Menurut VAN DEN BERG (2008), agen penyakit Gumboro mempunyai preledeksi khusus pada bursa *Fabricius* yang merupakan tempat pematangan limfosit B. Infeksi agen penyakit akan menyebar ke seluruh flock dengan mudah. Anak ayam yang terserang penyakit Gumboro akan terlihat lesu dengan sayap terkulai. Pada pemeriksaan patologi anatomi terlihat hemorrhagi pada daerah paha dan dada selain peradangan pada bursa *Fabricius*. Meskipun tingkat mortalitas penyakit Gumboro tergolong rendah (20-30%) namun dampak immunosupresif akibat kerusakan bursa *Fabricius* menyebabkan kerentanan terhadap patogen lain di umur lanjut.

Agen penyakit Gumboro tersebar luas dan menyebabkan kerugian ekonomi sehingga vaksinasi menjadi sangat penting dalam pengendalian penyakit. Umumnya vaksin Gumboro terdapat dalam bentuk *inactivated* atau *live attenuated* yang diberikan pada ayam umur 14 hari atau berdasarkan hasil pengujian tingkat *maternal derived antibody* (MDA).

Keberhasilan vaksinasi IBD sangat tergantung pada keselarasan antara waktu immunisasi dengan tingkat MDA karena adanya faktor interferensi diantara keduanya. Faktor variasi antigenik virus di lapangan juga akan mempengaruhi tingkat proteksi dari hasil vaksinasi (VAN DEN BERG, 2008). Terlebih lagi, virus Gumboro dengan patotipe *very virulent* dapat menginfeksi anak ayam walaupun dengan tingkat MDA yang tinggi (VAN DEN BERG, 2008). Untuk mengatasi masalah tersebut maka perlu dikembangkan strategi baru dengan menggunakan vaksin rekombinan yang dapat diaplikasikan secara *in ovo* sehingga mampu memberikan kekebalan pada anak ayam sejak usia dini.

Studi rekombinan HVT-IBDV oleh DARTEIL *et al.* (1995) mengintegrasikan gen VP2 di genom HVT pada dua tempat, yaitu lokus UL40 (tanpa menggunakan promoter) dan lokus US7 (menggunakan IHCMV promoter), sehingga menghasilkan dua jenis rekombinan rHVT-IBDV yaitu vHVT001 dan vHVT002. Pada uji tantang dengan IBDV strain G2170, vaksin vHVT002 memberikan tingkat proteksi yang lebih tinggi (60 – 100%) dibandingkan dengan rekombinan lainnya. Namun sayangnya, tingkat proteksi kedua rekombinan tersebut terhadap penyakit Marek's lebih rendah bila dibandingkan dengan tetua HVT.

BUBLLOT *et al.* (2007) melanjutkan penelitian rekombinan rHVT-IBDV dengan memasukkan gen VP2 (strain Faragher 52170) pada genom HVT di bagian lokus *inter genomic*. Rekombinan yang dihasilkan diidentifikasi sebagai vHVT13. Vaksin rekombinan tersebut kemudian diujicobakan pada ayam umur 1 hari (tingkat MDA maksimal) dan ternyata mampu memberikan proteksi 100% terhadap beberapa virus Gumboro, baik tipe klasik, sangat patogen maupun strain USA. Tingkat proteksi vaksin terhadap penyakit Marek's tidak berbeda dengan tetua HVT.

Studi lapangan oleh LE GROS *et al.* (2009) pada 2 *hatchery* berbeda membandingkan vaksin rekombinan vHVT13 (VAXXITEK® HVT-IBD, Merial) yang diaplikasikan secara subkutan pada DOC dengan vaksin *live attenuated* IBDV yang diaplikasikan pada umur 17 dan 24 hari secara *peroral*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vaksin rekombinan memberikan tingkat proteksi yang lebih tinggi dibandingkan dengan vaksin klasik IBDV.

Jadi penggunaan HVT sebagai vaksin vektor terhadap penyakit Gumboro dapat meningkatkan tingkat proteksi terhadap virus IBD dimana interferensi dengan MDA dapat dihindari. Penyisipan antigen protektif virus Gumboro yaitu VP2 pada genom HVT harus dilakukan pada lokus gen yang sesuai untuk mendapatkan klon rekombinan yang efektif untuk menghadapi dua sekaligus yaitu Gumboro dan Marek's.

Pengembangan vaksin rekombinan HVT untuk penyakit Newcastle Disease

Penyakit Newcastle Disease merupakan penyakit kontagius yang disebabkan oleh virus Newcastle Disease (NDV) dari genus *Avulavirus*, famili *Paramyxoviridae* (FAUQUET *et al.*, 2005). Virus berdiameter 18 nm dengan nukleokapsid berbentuk *herringbone* dengan 2 glikoprotein yaitu *Hemagglutinin-Neuraminidase* (H-N) dan *Fusion* (F). Menurut ALEXANDER dan JONES (2008), virus NDV secara patotipe dibagi menjadi 5 kelompok: yaitu *viscerotropic velogenic* (sangat ganas, menyerang pencernaan), *neurotropic velogenic* (sangat ganas, menyerang pernafasan dan syaraf), *mesogenic* (patogenitas sedang, menyerang pernafasan dan syaraf), *lentogenic* (patogenitas rendah, dengan gejala pernafasan dan syaraf) dan *asymptomatic enteric* (subklinis pada pencernaan).

Jenis induk semang yang rentan terhadap infeksi NDV sangat beragam dengan tingkat kepekaan yang berbeda-beda. Penyebaran penyakit sangat tergantung jenis organ yang terserang. Pada tipe pernafasan maka penularan utama terjadi secara *aerosol* atau *droplet*, sedangkan pada tipe pencernaan penularan terutama terjadi melalui feses. Kontaminasi virus di lingkungan merupakan sumber penularan selanjutnya. Peranan burung-burung liar diduga menjadi salah satu sumber penularan. Gejala klinis akan sangat beragam dari mortalitas 100% hingga subklinis, tergantung pada strain virus dan faktor induk semang (spesies, status kekebalan, umur dan kondisi). Penyebaran dan kejadian penyakit NDV menyebabkan kerugian ekonomi yang signifikan. Meskipun virus juga bersifat *zoonosis* namun kurang mendapat perhatian.

Pencegahan infeksi pada peternakan unggas dilakukan dengan cara peningkatan status kekebalan. Tiga jenis vaksin yang umumnya digunakan adalah vaksin hidup dari *strain lentogenic* (Hitcher B1, Lasota, V4 & F), vaksin hidup dari *attenuated strain mesogenic* (Roakin, Mukteswar, Komarow & H), dan vaksin inaktif dari galur *velogenic*. Penggunaan ketiga tipe vaksin tersebut dipengaruhi oleh kebijakan yang dibuat berdasarkan strain yang beredar di lapangan. Implementasi program vaksinasi dapat mengontrol tingkat kejadian dan penyebaran virus namun tetap saja beberapa permasalahan timbul, antara lain bermunculannya *strain* baru yang lebih patogen. Selain itu, adanya faktor interferensi MDA dapat mempengaruhi performa vaksin yang dipergunakan.

Pengembangan rekombinan vaksin NDV dengan HVT sebagai vektor umumnya dilakukan dengan cara menyisipkan gen penyandi glikoprotein H-N ataupun F pada lokus genom yang tidak essential. MORGAN *et al.* (1992) merancang dua rekombinan rHVT-NDV yang menyandi glikoprotein H-N dan F. Kedua rekombinan

tersebut diaplikasikan pada DOC secara *intra-abdominal* dan diuji tantang dengan galur *virulent* NDV strain Texas GB dan MDV strain RB-1. Tingkat proteksi terhadap penyakit Marek's masih sama dengan tetua HVT. Namun kedua jenis vaksin rekombinan tersebut, memberikan hasil yang berbeda untuk proteksi terhadap penyakit ND dimana rHVT/NDV(F) mampu memberikan tingkat proteksi yang lebih baik (90%) dibandingkan vaksin rHVT/NDV(HN) dengan hanya proteksi parsial saja (47%).

Penelitian lanjutan oleh MORGAN *et al.* (1993) membandingkan performa vaksin rHVT/NDV-F dengan vaksin hidup NDV strain Hitchner B1 pada ayam Broiler dan SPF galur Leghorn yang diuji tantang dengan NDV strain Texas GB. Kedua vaksin memberikan tingkat proteksi 100% untuk ayam SPF namun memberikan hasil yang sedikit berbeda untuk jenis broiler dimana tingkat proteksinya adalah 73% untuk vaksin rekombinan dan 80% untuk vaksin klasik. Perbedaan tingkat proteksi tersebut diduga disebabkan karena adanya perbedaan konsentrasi glikoprotein F pada kedua jenis vaksin tersebut.

Kemudian REDDY *et al.* (1996) menggunakan vaksin rekombinan HVT yang mengekspresikan 4 jenis gen sekaligus yaitu H-N (NDV), F (NDV), gA (MDV), dan gB (MDV). Vaksinasi dilakukan secara *in ovo* pada saat umur embryo 18 hari dan diuji tantang dengan NDV strain Texas GB dan MDV strain RB1. Tidak ada perbedaan tingkat proteksi antara rHVT dengan tetuanya terhadap penyakit Marek's. Vaksin rekombinan mampu menginduksi kekebalan sistemik terhadap penyakit ND namun replikasi NDV masih terdeteksi pada trakea. HECKERT *et al.* (1996) dengan menggunakan vaksin rekombinan yang sama melakukan uji tantang pada ayam SPF yang telah divaksin pada saat umur 1 hari dengan NDV strain Texas GB di umur 4, 7, 10 dan 14 hari. Tingkat kekebalan yang dihasilkan adalah 0%, 35 – 75%, 85% dan 94 – 100% secara berurutan sesuai dengan waktu uji tantang dilakukan. Terlihat bahwa tingkat protektif maksimal oleh vaksin tersebut didapatkan setelah umur 14 hari setelah vaksinasi. Kemudian RAUW *et al.* (2010) menggunakan vaksin rekombinan rHVT/NDV-F (*in ovo*, embryo 18 hari) yang kombinasi dengan vaksin hidup ND Nobilis Clone 30 dan chitosan secara *occulo-nasal* pada ayam galur Isa Brown umur 1 hari dan diuji tantang dengan NDV *velogenic viscerotropic* strain Chimalhuacan. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kombinasi dari ketiga perlakuan tersebut memberikan tingkat proteksi yang terbaik dan mampu menekan *shedding* virus secara signifikan dibandingkan dengan perlakuan secara terpisah.

Pada pengembangan vaksin rekombinan HVT dengan NDV, gen F dari NDV merupakan pilihan utama bila dibandingkan dengan gen H-N. Namun tidak menutup kemungkinan untuk menggunakan

kedua gen tersebut secara bersama-sama, bahkan penambahan gen dari virus lainnya masih bisa dimungkinkan. Penggunaan kombinasi vaksin rekombinan dengan vaksin ND klasik dan perlakuan lain seperti chitosan ternyata dapat meningkatkan performa dalam menghadapi penyakit ND.

Pengembangan vaksin rekombinan HVT untuk penyakit Avian Influenza

Flu burung merupakan penyakit yang sangat kontagius dan bersifat zoonosis yang disebabkan oleh virus Avian Influenza (AIV) dari genus Influenza A, famili *Orthomyxoviridae* (FAUQUET *et al.*, 2005). Morfologi virus bervariasi dari bentuk *pleomorfic*, *spherical* (< 150 nm) hingga bentuk filament memanjang (SUAREZ, 2008). Genom virus bersifat *negative sense* RNA yang terbagi menjadi 8 segmen yaitu *polymerase base 2* (PB2), *polymerase base 1* (PB1), *polymerase acidic* (PA), *hemagglutinin* (HA), *nucleoprotein* (NP), *neuraminidase* (NA), *matrix* (M1 & M2) dan *non-structural* (NS1 & NS2). Serotipe Influenza A dibagi berdasarkan pada kombinasi glikoprotein HA (1 – 16) dan NA (1 – 9). Untuk saat sekarang ini, AIV sub tipe H5N1 merupakan *strain* yang sedang mewabah dan menjadi pusat perhatian. Sub tipe H5N1 sendiri mempunyai genotipe yang beragam dan terbagi menjadi 10 clade yang mempunyai karakter yang berbeda-beda (SIMS dan BROWN, 2008; WHO, 2009).

Induk semang yang rentan terhadap virus H5N1 adalah unggas, namun tidak menutup kemungkinan spesies lain seperti mamalia dapat tertular. Penyebaran penyakit terjadi melalui kontak langsung maupun tidak langsung. Gejala klinis yang dihasilkan sangat bervariasi tergantung pada strain virus, status induk semang (spesies, umur, jenis kelamin dan status kekebalan) dan kondisi lingkungan. Kerugian akibat penyakit flu burung bukan hanya pada aspek ekonomi semata tetapi juga berdampak pada aspek zoonosis yang ditimbulkan.

Vaksinasi merupakan pendukung dari program pengendalian penyakit AI yang meliputi program lainnya seperti edukasi, biosekuriti, monitoring dan surveillance dan depopulasi. Implementasi program vaksinasi sangat dipengaruhi oleh agenda masing-masing negara sesuai dengan kebutuhan dan budget yang dimiliki. Karakteristik alami dari virus H5N1 yang sangat mudah bermutasi sangat mempengaruhi performa vaksin dalam menghadapi infeksi lapangan (SUAREZ, 2008). Tiga macam vaksin AI yang umumnya beredar di lapangan adalah vaksin inaktif klasik, vaksin rekombinan dan vaksin *reverse genetics*. Diantara ketiga vaksin tersebut, vaksin inaktif merupakan yang dominan di lapangan.

Pengembangan vaksin rekombinan untuk AI sudah banyak dilakukan, misalnya dengan baculovirus (HU *et al.*, 2006), adenovirus (TORO *et al.*, 2008), infectious laryngotracheitis (PAVLOVA *et al.*, 2009) dan NDV (VEITS *et al.*, 2006). Namun, pengembangan vektor HVT untuk vaksin AI masih terbatas. LAN *et al.* (2009) merancang rekombinan HVT untuk gen HA dari isolat A/Gs/Gd/1/96 (H5N1) yang difasilitasi oleh vektor BAC dengan Red/ET sebagai sistem mutagenesis. Gen HA diintegrasikan pada lokus U2 yang tidak essential bagi HVT. Beberapa klon rHVT-HA yang dihasilkan berhasil ditransfeksikan kembali ke dalam *cell culture*. Kemudian RAUW *et al.* (2011) membandingkan performa vaksin rekombinan rHVT-H5 (Vectormune® AI, Ceva) dengan vaksin inaktif H5N2 (Ceva). Vaksin rHVT-H5 dibuat dengan HVT strain FC126 menggunakan gen HA dari isolat A/swan/Hungary/4999/2006. Sedangkan vaksin H5N2 inaktif merupakan vaksin *cocktail* dengan seed vaksin AI dari Mexico 2004 dan ND La Sota. Tingkat protektivitas kedua jenis vaksin tersebut ditantang dengan dua isolat HPAI H5N1 yang berbeda yaitu A/Ck/Egypt/709-VIRO8/2007 dan A/Ck/Egypt/1709-6/2008. Pada uji tanggap dengan strain Egypt 2006, kedua vaksin mampu memberikan proteksi terhadap uji tanggap. Namun pada uji tanggap dengan strain Egypt 2008, hanya vaksin rekombinan rHVT-H5 yang mampu memberikan proteksi.

Penggunaan HVT sebagai *live* vektor untuk mengekspresikan gen H5 (AIV) mampu menginduksi respon tanggap kebal yang protektif. Namun, adanya kecenderungan faktor homologi antara *seed* vaksin dengan strain tanggap menandakan bahwa *seed* vaksin rekombinan rHVT-AIV perlu untuk di *update* secara berkala sesuai dengan strain virus yang beredar di lapangan.

Pertimbangan penggunaan vaksin rekombinan HVT di Indonesia

Seiring kemajuan industri perunggasan di Indonesia maka permasalahan yang dihadapi juga semakin kompleks, terutama tentang kesehatan hewan. Program vaksinasi merupakan kebutuhan mutlak untuk mengantisipasi berbagai penyakit, terutama virus. Namun kondisi lapangan dimana patogen yang beredar sangatlah beragam menyebabkan pelaksanaan program vaksinasi menjadi sangat kompleks dan sering kali tidak efisien. Penggunaan rekombinan vaksin merupakan suatu terobosan untuk menghadapi beberapa penyakit secara sekaligus. Vaksin rekombinan HVT mempunyai keuntungan dimana aplikasi tunggal dapat menginduksi kekebalan seumur hidup dan tanpa ada interferensi dengan MDA sehingga dapat diterapkan secara massal

di peternakan pembibitan. Pada peternakan unggas komersial seperti peternakan *broiler*, metode vaksinasi untuk beberapa penyakit sekaligus di unit pembibitan dapat meningkatkan efisiensi produksi baik dari segi waktu maupun biaya.

Walaupun vaksin rekombinan telah menunjukkan performa yang memuaskan untuk skala laboratorium, namun implementasinya di lapangan masih terkendala dengan isu GMO (*genetic modified organism*) yang masih diperdebatkan di beberapa negara, termasuk Indonesia. Disamping motif ekonomi (hak paten dan monopoli), pertimbangan yang lebih rasional adalah dampaknya terhadap lingkungan (ADLHIYATI, 2009). Introduksi makhluk baru termasuk produk rekayasa genetik dikhawatirkan akan mengganggu keseimbangan ekosistem. Selain itu, kestabilan genetik GMO di lingkungan masih dipertanyakan. Namun jika isu lingkungan yang menjadi dasar pertimbangan, maka rekombinan vaksin HVT merupakan pilihan yang paling sesuai karena transmisi horizontalnya secara alami sangat terbatas sehingga kemungkinan kontaminasi ke lingkungan lebih rendah dibandingkan dengan vektor vaksin yang lainnya.

Tidak bisa dipungkiri bahwa untuk kedepannya, tren untuk penggunaan rekombinan vaksin di bidang peternakan akan semakin menguat. Kesiapan pemerintah baik dari segi legislasi maupun perangkat pendukung sangat diperlukan untuk mengatur dan mengawasi aplikasi GMO termasuk rekombinan vaksin sehingga dampak negatifnya terhadap lingkungan bisa diminimalisasi.

KESIMPULAN

Pengembangan HVT sebagai vektor vaksin terhadap beberapa patogen virus merupakan terobosan dalam pencegahan penyakit di unggas secara terintegrasi. Pengembangan vaksin rekombinan tersebut bukan hanya dikhususkan untuk satu macam penyakit saja tetapi juga dimungkinkan untuk beberapa virus sekaligus. Keunggulan dari penggunaan HVT sebagai vektor rekombinan adalah aplikasi hanya sekali untuk menginduksi kekebalan seumur hidup dan tidak adanya interferensi dengan MDA. Selain itu, faktor induk semang yang terbatas pada ayam dan kalkun dengan penyebaran horizontal yang sangat terbatas juga merupakan faktor pendukung penggunaannya sebagai vaksin *genetic modified organism* (GMO). Walaupun penelitian di laboratorium telah menunjukkan performa yang memuaskan, namun penggunaan vaksin rekombinan HVT masih diperdebatkan di beberapa negara termasuk Indonesia sehingga aplikasinya masih harus menunggu selesainya legislasi yang mengatur tentang GMO.

DAFTAR PUSTAKA

- ADLHIYATI, Z. 2009. Produk Rekayasa Genetika (GMO/genetically modified organism) Sebagai Subjek Perlindungan Paten dan Perlindungan Varietas Tanaman. Tesis. Program Magister Ilmu Hukum Universitas Diponegoro, Semarang. 189 hlm.
- AFONSO, C.L., E.R. TULMAN, Z. LU, L. ZSAK, D.L. ROCK and G.F. KUTISH. 2001. The genome of turkey herpesvirus. *J. Virol.* 75: 971 – 978.
- ALEXANDER, D.J. and R.C. JONES. 2008. Paramyxoviridae. *In: Poultry Diseases. Sixth Edition.* PATTISON, M., P.F. MCMULLIN, J.M. BRADBURY and D.J. ALEXANDER. (Eds.). W.B. Saunders, Edinburgh. pp. 294 – 316.
- BAIGENT, S.J. and F. DAVIDSON. 2004. Marek's disease virus: biology and life cycle. *In: Marek's Disease: An Envolving Problem.* DAVIDSON, F. and V. NAIR. (Ed.). Elsevier Academic Press, London. pp. 62 – 77.
- BAIGENT, S.J., L.J. PETHERBRIDGE, L.P. SMITH, Y. ZHAO, P.M. CHESTERS and V.K. NAIR. 2006. Herpesvirus of turkey reconstituted from bacterial artificial chromosome clones induces protection against Marek's disease. *J. Gen. Virol.* 87: 769 – 776.
- BIGGS, P.M. 2001. The history and biology of Marek's disease virus. *In: Marek's Disease.* HIRAI, K. (Ed.). Springer, Berlin. pp. 2 – 24.
- BRUNE, W., M. MESSERLE and U.H. KOSZINOWSKI. 2000. Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Gen.* 16: 254 – 259.
- BUBLOT, M. and J.M. SHARMA. 2004. Vaccination against Marek's disease. *In: Marek's Disease: An Envolving Problem.* DAVIDSON, F. and V. NAIR (Ed.). Elsevier Academic Press, London. pp. 168 – 185.
- BUBLOT, M., N. PRITCHARD, F.X. LE GROS and S. GOUTEBROZE. 2007. Use of a vectored vaccine against infectious bursal disease of chickens in the face of high-titred maternally derived antibody. *J Comp. Pathol.* 137: S81 – S84.
- CALNEK, B.W. 2001. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *In: Marek's Disease.* HIRAI, K. (Ed.). Springer, Berlin. pp. 25 – 55.
- CALNEK, B.W. and R.L. WITTER. 1991. Marek's disease. *In: Diseases of Poultry. Ninth Edition.* CALNEK, B.W., H.J. BARNES, C.W. BEARD, W.M. REID and H.W. YODER, JR. (Eds.). Iowa State University Press, Iowa. pp. 342 – 385.
- CALNEK, B.W., H.K. ADLINDER and D.E. KAHN. 1970. Feather follicle epithelium: A source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Dis.* 14: 219 – 233.
- CHEN, M., W.S. PAYNE, H. HUNT, H. ZHANG, S.L. HOLMEN and J.B. DODGSON. 2008. Inhibition of Marek's disease virus replication by retroviral vector-based RNA interference. *Virology* 377: 265 – 272.
- DARTEIL, R., M. BUBLOT, E. LAPLACE, J.F. BOUQUET, J.C. AUDONNET and M. RIVIÈRE. 1995. Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology* 211: 481 – 490.
- DAVISON, A.J. 2010. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol* 143: 52 – 69.
- FABRICANT, J., B.W. CALNEK and K.A. SCHAT. 1982. The early pathogenesis of turkey herpesvirus infection in chickens and turkeys. *Avian Dis* 26: 257 – 264.
- FAUQUET, C.M., M.A. MAYO, J. MANILOFF, U. DESSELBERGER and L.A. BALL. 2005. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego.
- GIBBS, C.P., K. NAZERIAN, L.F. VELICER and H.J. KUNG. 1984. Extensive homology exists between Marek's disease herpesvirus and its vaccine virus, herpesvirus of turkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3365 – 3369.
- GIMENO, I.M. 2008. Marek's disease vaccines: A solution for today but a worry for tomorrow? *Vaccine* 26: C31 – C41.
- HECKERT, R.A., J. RIVA, S. COOK, J. MCMILLEN and R.D. SCHWARTZ. 1996. Onset of protective immunity in chicks after vaccination with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing Newcastle disease virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase antigens. *Avian Dis.* 40: 770 – 777.
- HIRAI, K. and M. SAKAGUCHI. 2001. Polyvalent recombinant Marek's disease virus vaccine against poultry diseases. *In: Marek's Disease.* HIRAI, K. (Ed.). Springer, Berlin. pp. 261 – 287.
- HOLLAND, M.S., C.D. MACKENZIE, R.W. BULL and R.F. SILVA. 1998. Latent turkey herpesvirus infection in lymphoid, nervous, and feather tissues of chickens. *Avian Dis.* 42: 292 – 299.
- HU, Y.C., Y.L. LUO, W.T. JI, J.L.C. CHULU, P.C. CHANG, H. SHIEH, C.Y. WANG and H.J. LIU. 2006. Dual expression of the HA protein of H5N2 Avian Influenza virus in a baculovirus system. *J. Virol. Methods* 135: 43 – 48.
- KAWAMURA, H., J.D.J. KING and D.P. ANDERSON. 1969. A herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys. *Avian Dis.* 13: 853 – 863.
- KINGHAM, B.F., V. ZELNÍK, J. KOPÁČEK, V. MAJERČIAK, E. NEY and C.J. SCHMIDT. 2001. The genome of herpesvirus of turkeys: Comparative analysis with Marek's disease viruses. *J. Gen. Virol.* 82: 1123 – 1135.
- KREAGER, K.S. 1998. Chicken industry strategies for control of tumor virus infections. *Poult. Sci.* 77: 1213 – 1216.

- LAMBETH, L.S., Y. ZHAO, L.P. SMITH, L. KGOSANA and V. NAIR. 2009. Targeting Marek's disease virus by RNA interference delivered from a herpesvirus vaccine. *Vaccine* 27: 298 – 306.
- LAN, D., X. SHI, Y. WANG, C. LIU, M. WANG, H. CUI, G. TIAN, J. LI and G.Z. TONG. 2009. Construction of a recombinant HVT virus expressing the HA gene of Avian Influenza virus H5N1 via Rde/ET recombination system. *Acta Microbiol. Sin.* 49: 78 – 84.
- LE GROS, F.X., A. DANCER, C. GIACOMINI, L. PIZZONI, M. BUBLOT, M. GRAZIANI and F. PRANDINI. 2009. Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine* 27: 592 – 596.
- MORGAN, R.W., J.J. GELB, C.R. POPE and P.J.A. SONDERMEIJER. 1993. Efficacy in chickens of a herpesvirus of turkeys recombinant vaccine containing the fusion gene of Newcastle disease virus: onset of protection and effect of maternal antibodies. *Avian Dis.* 37: 1032 – 1040.
- MORGAN, R.W., J.J. GELB, C.S. SCHREURS, D. LÜTTICKEN, J.K. ROSENBERGER and P.J.A. SONDERMEIJER. 1992. Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. *Avian Dis* 36: 858 – 870.
- NAIR, V. 2005. Evolution of Marek's disease - a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *Vet. J.* 170: 175 – 183.
- NAIR, V., R.C. JONES and R.E. GOUGH. 2008. Herpesviridae. *In: Poultry Diseases*. Sixth Edition. PATTISON, M., P.F. MCMULLIN, J.M. BRADBURY and D.J. ALEXANDER. (Eds.). W.B. Saunders, Edinburgh. pp. 258 – 275.
- NAZERIAN, K. and R.L. WITTER. 1970. Cell-free transmission and *in vivo* replication of Marek's disease virus. *J Virol.* 5: 388-397.
- NAZERIAN, K., L.F. LEE, R.L. WITTER and B.R. BURMESTER. 1971. Ultrastructural studies of a herpesvirus of turkeys antigenically related to Marek's disease virus. *Virology* 43: 442 – 452.
- OKADA, K., Y. FUJIMOTO, T. MIKAMI and K. YONEHARA. 1972. The fine structure of Marek's disease virus and herpesvirus of turkey in cell culture. *Japanese. J. Vet. Res.* 20: 57 – 68.
- OKAZAKI, W., H.G. PURCHASE and B.R. BURMESTER. 1970. Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. *Avian Dis.* 14: 413 – 429.
- OSTERRIEDER, K. and J.F. VAUTHEROT. 2004. The genome content of Marek's disease-like viruses. *In: Marek's Disease: An Envolving Problem*. DAVIDSON, F. and V. NAIR. (Eds.). Elsevier Academic Press, London. pp. 17 – 31.
- PAVLOVA, S.P., J., VEITS, G.M. KEIL, T.C. METTENLEITER and W. FUCHS. 2009. Protection of chickens against H5N1 highly pathogenic Avian Influenza virus infection by live vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing H5 hemagglutinin and N1 neuraminidase. *Vaccine* 27: 773 – 785.
- RAUW, F., V. PALYA, S. VAN BORM, S. WELBY, T. TATAR-KIS, Y. GARDIN, K.M. DORSEY, M.M. ALY, M.K. HASSAN, M.A., SOLIMAN, B. LAMBRECHT and T. VAN DEN BERG. 2011. Further evidence of antigenic drift and protective efficacy afforded by a recombinant HVT-H5 vaccine against challenge with two antigenically divergent Egyptian clade 2.2.1 HPAI H5N1 strains. *Vaccine* 29: 2590 – 2600.
- RAUW, F., Y. GARDIN, V. PALYA, S. ANBARI, S. LEMAIRE, M. BOSCHMANS, T. VAN DEN BERG and B. LAMBRECHT. 2010. Improved vaccination against Newcastle disease by an *in ovo* recombinant HVT-ND combined with an adjuvanted live vaccine at day-old. *Vaccine* 28: 823 – 833.
- REDDY, S.K., J.M. SHARMA, J. AHMAD, D.N. REDDY, J.K. MCMILLEN, S.M. COOK, M.A. WILD and R.D. SCHWARTZ. 1996. Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an *in ovo* vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens. *Vaccine* 14: 469 – 477.
- ROSS, L.J.N. 1998. Recombinant vaccines against Marek's disease. *Avian Pathol.* 27: S65 – S73.
- ROSS, L.J.N., G. O'SULLIVAN and F. COUDERT. 1996. Influence of chicken genotype on protection against Marek's disease by a herpesvirus of turkeys recombinant expressing the glycoprotein B (gB) of Marek's disease virus. *Vaccine* 14: 187 – 189.
- ROSS, L.J.N., M.M. BINNS, P. TYERS, J. PASTOREK, V. ZELNIK and S. SCOTT. 1993. Construction and properties of a turkey herpesvirus recombinant expressing the Marek's disease virus homologue of glycoprotein B of herpes simplex virus. *J. Gen. Virol.* 74: 371 – 377.
- SIMS, L.D. and I.H. BROWN. 2008. Multicontinental epidemic of H5N1 HPAI virus (1996 – 2007). *In: Avian Influenza*. First Edition. SWAYNE, D.E. (Ed.). Blackwell Publishing, Iowa. pp. 251 – 266.
- SONDERMEIJER, P.J.A., J.A.J. CLAESSENS, P.E., JENNISKENS, A.P. ADRIAN MOCKETT, R.A.J. THIJSEN, M.J. WILLEMSE and R.W. MORGAN. 1993. Avian herpesvirus as a live viral vector for the expression of heterologous antigens. *Vaccine* 11: 349 – 358.
- SUAREZ, D.L. 2008. Influenza A virus. *In: Avian Influenza*. First Edition. SWAYNE, D.E. (Ed.). Blackwell Publishing, Iowa. pp. 3 – 22.
- TORO, H., D.C. TANG, D.L. SUAREZ, J. ZHANG and Z. SHI. 2008. Protection of chickens against Avian Influenza with non-replicating adenovirus-vectored vaccine. *Vaccine* 26: 2640 – 2646.

- VAN DEN BERG, T. 2008. Birnaviridae. *In: Poultry Diseases. Sixth Edition.* PATTISON, M., P.F. MCMULLIN, J.M. BRADBURY and D.J. ALEXANDER. (Ed). W.B. Saunders, Edinburgh. pp. 359 – 366.
- VEITS, J., D. WIESNER, W. FUCHS, B. HOFFMANN, H. GRANZOW, E. STARICK, E. MUNDT, H. SCHIRRMIEIER, T. MEBATION, T.C. METTENLEITER and A. RÖMER-OBERDÖRFER. 2006. Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and Avian Influenza. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8197 – 8202.
- WHO. 2009. Continuing progress towards a unified nomenclature system for the highly pathogenic H5N1 Avian Influenza viruses. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/nomenclature/en/index.html. (1 August 2009).
- WITTER, R.L. (2001). Protective efficacy of Marek's disease vaccines. *In: Marek's Disease.* HIRAI, K. (Ed.). Springer, Berlin. pp. 57 – 90.
- WITTER, R.L. 1997. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis.* 41: 149 – 163.
- WITTER, R.L. 1998. The changing landscape of Marek's disease. *Avian Pathol.* 27: S46 – S53.
- WITTER, R.L., J.M. SHARMA and L. OFFENBECKER. 1976. Turkey herpesvirus infection in chickens: induction of lymphoproliferative lesions and characterization of vaccinal immunity against Marek's disease. *Avian Dis.* 20: 676 – 692.