

Aan de minister van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
Mevrouw J.C. Huizinga-Heringa
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 20 september 2010
KENMERK CGM/100920-01
ONDERWERP Advies: Werkzaamheden met gg-EIAV getransduceerde kippen

Geachte mevrouw Huizinga,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 10-049 met de titel 'Fluorescentie metingen en DNA analyse aan genetisch gemodificeerde eieren en kippen die het "Enhanced Green Fluorescent Protein" tot expressie brengen' van het Centraal Veterinair Instituut van de Wageningen UR, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met eieren en sperma van twee transgene kippenlijnen en van werkzaamheden met de daaruit voortkomende nakomelingen. De transgene kippenlijnen zijn gegenereerd met lentivirale vectoren die gebaseerd zijn op het zogenaamde *Equine infectious anemia virus* (EIAV) en brengen beide een fluorescerend eiwit tot expressie. Op basis van de fluorescentie wil de aanvrager een methode ontwikkelen om eieren waaruit hanen komen, te kunnen onderscheiden van eieren waaruit hennen komen. Hiermee hoopt de aanvrager het afmaken van eendagshaantjes te voorkomen. De aanvrager wil de laboratoriumwerkzaamheden uitvoeren op D-I en ML-I inperkingsniveau. De meting van de fluorescentie verzoekt de aanvrager buiten inperking te mogen uitvoeren.

Het EIAV is door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. De COGEM is van mening dat de wijze waarop de genetisch gemodificeerde EIAV geproduceerd is, het meeste lijkt op een tweede generatie productiesysteem voor HIV-gebaseerde zelf-inactiverende vectoren. Hierdoor acht de COGEM de kans uitermate klein dat er tijdens de productie replicatiecompetent lentivirus is ontstaan. Gezien de relatief korte halfwaardetijd van lentivirale vectoren bij de lichaamstemperatuur van de kip acht de COGEM de kans op vrije vectordeeltjes in nakomelingen van de *in ovo* getransduceerde kippen verwaarloosbaar klein. Door de afwezigheid van aviaire lentivirussen is de COGEM tevens van mening dat de kans op complementatie en recombinatie van de geïntegreerde vector verwaarloosbaar klein is.

Op basis van bovengenoemde afweging adviseert de COGEM de voorgenomen werkzaamheden met nakomelingen en eieren of sperma van de nakomelingen van de *in ovo* getransduceerde kippen op respectievelijk D-I en ML-I inperkingsniveau in te schalen. De fluorescentiemeting kan onder enkele aanvullende voorschriften buiten inperking worden uitgevoerd.

Op bovengenoemde inperkingsniveau's en onder navolging van gestelde voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu die verbonden zijn aan werkzaamheden met nakomelingen en eieren of sperma van de nakomelingen van de *in ovo* getransduceerde kippen verwaarloosbaar klein.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop followed by a horizontal line that ends in a small hook.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Inschaling van werkzaamheden met gg-EIAV getransduceerde kippen

COGEM advies CGM/100920-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met eieren en/of sperma van twee transgene kippenlijnen en met daaruit voortkomende nakomelingen van deze kippenlijnen. De betreffende transgene kippen zijn gegenereerd in het Roslin Instituut te Edinburgh door transductie van kippenkiembaancellen met een genetisch gemodificeerde *Equine infectious anemia virus* vector (gg-EIAV). Hierdoor brengen deze kippenlijnen eGFP tot expressie. Op basis van de fluorescentie van het eGFP tracht de aanvrager een methode te ontwikkelen om ‘mannelijke’ eieren te kunnen onderscheiden van ‘vrouwelijke’ eieren. Met deze methode hoopt de aanvrager dat de eieren vóór bebroeding gescreend kunnen worden, zodat het doden van overbodige eendagshaantjes kan worden voorkomen.

Equine infectious anemia virus

Het *Equine infectious anemia virus* (EIAV) is een enkelstrengs RNA virus dat behoort tot de lentivirussen, familie der *Retroviridae*. Het genoom van EIAV is relatief eenvoudig van opzet. Het EIAV genoom heeft aan weerszijden een zogenaamde ‘Long Terminal Repeat’ (LTR) en bevat daarnaast een packagingsignaal, drie structurele genen (*gag*, *pol* en *env*) en drie regulatoire/accessoire genen (*tat*, *rev* en *S2*).¹

De LTR's spelen een belangrijke rol bij de integratie van het virale genoom in het genoom van de gastheer en bij de synthese van het lentivirale RNA. Een LTR bestaat uit een unieke 3' sequentie (U3), een repeat regio (R) en een uniek 5' (U5) domein. De structurele Gag eiwitten vervullen verschillende functies in de virusassemblage. Het *env* gen codeert voor het virale envelopeiwit dat verantwoordelijk is voor de binding van het virus aan de gastheer cel. Het *pol* gen codeert zowel voor het enzym reverse transcriptase als voor het enzym integrase.

Naast de structurele eiwitten codeert het genoom ook voor de regulatoire/accessoire eiwitten Tat, Rev en S2. Tat is een transcriptiefactor die noodzakelijk is voor de productie van genomisch lentiviraal RNA. Rev is een ‘shuttle’ eiwit voor virale transcripten en reguleert hierdoor de expressie van de virale genen. Het S2 eiwit reguleert de cytokine- en chemokine-respons in macrofagen en speelt daarbij een belangrijke rol in de virale pathogeniteit.²

Pathogeniteit

Het EIAV veroorzaakt de zogenaamde ‘Equine Infectieuze Anemie’ (EIA). Dit is een besmettelijke vorm van bloedarmoede die alleen voorkomt bij paarden, muil dieren en ezels en uiteindelijk kan leiden tot de dood van het getroffen dier.³ De ziekte komt wereldwijd voor. In Europa hebben in 2006 uitbraken van EIA plaatsgevonden in Italië, Ierland en Duitsland. De ziekte is endemisch in Roemenië. Nederland is officieel vrij van dit virus. Er bestaat een

effectieve methode, de zogenaamde Cogginstest, om besmetting in paarden aan te tonen.⁴ Er is echter geen vaccin tegen EIA beschikbaar.

De klinische symptomen van met EIAV besmette dieren zijn niet specifiek en daardoor lastig vast te stellen. De ziekte kan zowel acuut als chronisch verlopen. Bij een acute vorm van EIA kan de mortaliteit 80% bedragen, maar over het algemeen is de mortaliteit laag.⁵ Wanneer het dier de eerste infectie met EIAV overleeft heeft, kan het een chronische vorm van EIA ontwikkelen waarbij gewichtsverlies, oedeem aan buik en benen, koorts en bloedarmoede enkele van de symptomen zijn. Verreweg de meeste geïnfekteerde paarden vertonen na een jaar geen klinische symptomen meer. Eenmaal geïnfekteerd is een dier levenslang drager en kan het de infectie overdragen op andere paardachtigen.

Transmissie

De transmissie van het virus vindt plaats door de overdracht van bloed van een geïnfekteerde paardachtige. Ook sperma van geïnfekteerde hengsten is besmettelijk. In de praktijk wordt het merendeel van de besmettingen veroorzaakt door dazen (steekvliegen), die ook in Nederland voorkomen.⁶ De transmissie vindt zuiver mechanisch plaats via besmet bloed aan de monddelen van de vlieg. Het virus kan zich niet repliceren in de vector en is maar een geringe tijd (tot 4 uur) levensvatbaar op de vector. Bij recente uitbraken in West-Europa lijkt ook iatrogene overdracht, o.a. het gebruik van besmette bloedproducten, een belangrijke rol te hebben gespeeld.

gg-EIAV

Lentivirale vectoren worden veelvuldig gebruikt als genoverdrachtsysteem.⁷⁻⁹ Deze vectoren infecteren zowel delende als niet-delende cellen en zorgen voor een stabiele integratie in het genoom van de geïnfekteerde cel. In de meeste gevallen wordt het genoom van het *Human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1) gebruikt als basis voor de lentivirale vectoren. In de onderhavige aanvraag wordt echter gebruik gemaakt van lentivirale vectoren die gebaseerd zijn op het genoom van het *Equine infectious anemia virus* (EIAV).

Uit veiligheidsoogpunt is het van belang dat er tijdens de vectorproductie geen replicatiecompetent lentivirus (RCL) kan ontstaan. Teneinde dit te voorkomen, zijn in de loop der jaren diverse vectorsystemen ontwikkeld. Met een afnemende kans op RCL vorming zijn dat de eerste, tweede en derde generatie lentivirale productiesystemen. Bij deze systemen zijn de virale genen die nodig zijn voor de productie van de vector, verdeeld over een toenemend aantal plasmiden. Hierdoor wordt de kans gereduceerd dat de genen door recombinatie samenkomen in één genoom, wat kan leiden tot een replicerend virus.

De gg-EIAV vectoren, waarmee de transgene kippen gegenereerd zijn, zijn geproduceerd met behulp van een drietal plasmiden, de zogenaamde 'transfervector', het 'packagingconstruct' en het 'envelopcoderende plasmide'.

Beide transfervectoren, pONY8.0G en pONY8.4GCZ, missen de *enhancer* en *promoter* sequenties van de 3' *Long Terminal Repeats* (LTR's) en zijn hierdoor zelf-inactiverend (SIN).^{10,11} De frequentie (~titer) van mobilisatie wordt bij afwezigheid van deze sequenties circa 100-1000 maal lager. De kans op mobilisatie van SIN vectoren uit de getransduceerde cel na infectie met

een completerend wildtype virus wordt derhalve uitermate klein geacht.^{12,13} Het gebruikte packagingconstruct, het zogenaamde pONY3.1, mist een deel van het *env* gen, de complete 5'LTR en het U5 en R domein van de 3'LTR.¹⁴ Het packagingconstruct codeert nog wel voor de Gag, Pol, Tat, Rev en S2 eiwitten. Het envelopcoderende plasmide codeert voor het glycoproteïne G eiwit van het *Vesicular stomatitis virus* (VSV-G). Derhalve bevat het virusmembraan van de resulterende vector niet het oorspronkelijke envelopeiwit (*env*), maar het glycoproteïne G eiwit en kan het gg-EIAV een groot aantal celtypen infecteren. De lentivirale vector heeft hierdoor een groter gastheerbereik en weefseltropisme verkregen.

Doordat de diverse genen die nodig zijn om een virusdeeltje te produceren verdeeld zijn over drie plasmiden, is de kans op RCL vorming aanzienlijk verkleind. Dit blijkt ook uit het feit dat bij vergelijkbare productiesystemen voor HIV-gebaseerde SIN-vectoren in de wetenschappelijke literatuur nog nooit RCL vorming is gerapporteerd.

De voorgenomen werkzaamheden

De transgene kippenlijnen waarmee de aanvrager wil gaan werken zijn gegenereerd in het Roslin Instituut te Edingburgh. Dit instituut heeft zich bereid verklaard bevruchte eieren en/of sperma van de transgene kippenlijnen ter beschikking te stellen aan de aanvrager. Het is op dit moment echter nog niet precies duidelijk in welke vorm en hoeveelheid het transgene materiaal opgestuurd zal worden.

De aanvrager wil bevruchte eieren afkomstig van transgene kippen of eieren bevrucht met het transgene sperma uitbroeden en de kuikens opgroeien tot geslachtsrijpe transgene hanen en hennen. Deze kippen zullen gebruikt worden om een populatie transgene leghennen op te bouwen, die voldoende eGFP-expresserende eieren legt om het beoogde onderzoek te kunnen uitvoeren.

Van de transgene hanen en hennen zal bloed en/of sperma afgenomen worden voor DNA analyse. Tevens zal door middel van fluorescentie meting de expressie van eGFP op intacte eieren en geprepareerde kiemschijven van de eieren worden bepaald. De aanvrager verzoekt de fluorescentiemeting van de intacte eGFP-eieren en geprepareerde kiemschijven in een niet-gesloten opstelling buiten inperking uit te mogen voeren. Hij merkt daarbij op dat de meting een open handeling betreft.

Eerder COGEM advies

Onlangs heeft de COGEM de classificatie van het EIAV tegen het licht gehouden. Op basis van de pathogeniteit van het EIAV en de mate van transmissie heeft zij EIAV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹⁵ Conform het COGEM advies 'classificatie van dierpathogen virussen' heeft de COGEM daarbij geadviseerd de gg-werkzaamheden met dit virus uit te voeren in ruimten die voldoen aan ML-II en DM-II inrichtings- en werkvoorschriften.¹⁶

Op basis van de indeling van HIV-1 in pathogeniteitsklasse 3, worden laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren die gebaseerd zijn op HIV-1 conform de Regeling GGO ingeschaald op ML-III en DM-III inperkingsniveau. In 2009 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met dit type lentivirale

vectoren.¹⁷ In het generieke advies heeft de COGEM drie aspecten gedefinieerd, die zij van elementair belang acht voor de risicoanalyse en waarop zij een eventuele lagere inschaling van de werkzaamheden baseert. Het betreft:

- de mogelijke vorming van replicatiecompetent lentivirus (RCL),
- de aanwezigheid en concentratie van vrije vectordeeltjes,
- de kans op complementatie en mobilisatie van de vector.

Naast deze aspecten is de inschaling die de COGEM adviseert mede afhankelijk van het type transfervector en het gebruikte productiesysteem. In het geval van *in vivo* gebruik van lentivirale vectoren is het daarbij tevens van belang te weten of de betreffende proefdieren geïnfecteerd zijn of kunnen worden met een lentivirus.

De COGEM heeft in haar generieke advies geadviseerd de werkzaamheden met nakomelingen van dieren die getransduceerd zijn met lentivirale vectoren, die geproduceerd zijn met een productiesysteem van de tweede of derde generatie, vanaf de F1 generatie op D-I inperkingsniveau in te schalen. Daar heeft zij de voorwaarde aan verbonden dat het dieren dienen te zijn, waarvoor geen lentivirussen bekend zijn, of waarvoor afdoende is bewezen dat de dieren negatief zijn voor betreffende virussen.

Voor de handelingen met cellen of weefsels afkomstig van nakomelingen van getransduceerde dieren die zijn gehuisvest op D-I is de COGEM van mening dat de werkzaamheden zonder aanvullende voorschriften op ML-I uitgevoerd kunnen worden.

Overweging

Kans op replicatiecompetent lentivirus tijdens productie van gg-EIAV

De verschillende genen die nodig zijn voor de productie van gg-EIAV zijn verdeeld over drie verschillende plasmiden. Daarbij is de transfervector door verwijdering van een deel van de 3'LTR een SIN vector. Hierdoor moeten er minimaal twee recombinaties optreden en dient de LTR van de SIN vector gerepareerd te worden, voordat er RCL kan ontstaan.

Aangezien de regulatoire genen en de *gag* en *pol* genen op hetzelfde packagingconstruct liggen, is de COGEM van mening dat het productiesysteem voor de gg-EIAV vector qua veiligheidskenmerken het best te vergelijken valt met een tweede generatie productiesysteem voor een HIV-gebaseerde SIN-vector. Vectoren geproduceerd met dit productiesysteem worden al jaren toegepast voor wetenschappelijk onderzoek. Bij de productie van deze HIV-gebaseerde vectoren is in de wetenschappelijke literatuur nog nooit gerapporteerd dat er RCL is ontstaan. Door de relatief recente ontwikkeling van vectoren die gebaseerd zijn op EIAV is er minder ervaring met de grootschalige productie en het gebruik van de gg-EIAV vectoren. Een publicatie over de ontwikkeling van een RCL-test voor EIAV vectoren laat evenwel zien dat bij het testen van 5% van een klinische virusbatch (1×10^9 transducerende units) geen RCL werd aangetroffen.¹⁸ Op basis van deze gegevens acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er in de virusbatch, die gebruikt is voor het genereren van de transgene kippenlijnen RCL aanwezig was. In de aangeleverde informatie wordt niet vermeld of de virusbatch getest is op de aanwezigheid van RCL. Derhalve kan de COGEM niet volledig uitsluiten dat er tijdens de productie van de gg-

EIAV vectoren RCL is ontstaan en tijdens de *in ovo* transductie in de transgene kippen terecht zijn gekomen. Echter, omdat EIAV niet replicateert in kippen is de COGEM van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is, dat een eventueel aanwezige RCL in de transgene kippen zal repliceren.

De kans op vrije vectordeeltjes en RCL-vorming in de transgene kippen

Voor de generatie van de transgene kippen, is de gg-EIAV ingespoten in bevruchte kippeneieren. De stabiliteit van retrovirale deeltjes is omgekeerd evenredig met de temperatuur. De halfwaardetijd van op HIV-1 gebaseerde vectoren is bij 37°C ongeveer 10 uur en die van op *Moloney murine leukemia virus* gebaseerde vectoren ongeveer 4 uur.¹⁹ Toename van de temperatuur en aanwezigheid van bijvoorbeeld serum verlaagt de halfwaardetijd nog verder. De lichaamstemperatuur van kippen bedraagt ongeveer 41°C. Gebaseerd op deze gegevens en het tijdsbestek tussen transductie van de eieren en het geslachtsrijp worden van de hanen/ hennen acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat eieren en sperma van de *in ovo* getransduceerde dieren vrije vectordeeltjes zullen bevatten en hiermee uitgescheiden worden. Immers, met een uitgangs-inoculum van 10^9 transducerende units, en een halfwaardetijd van 10 uur zullen binnen 12 dagen alle virusdeeltjes geïnactiveerd zijn. Bovendien worden de vectordeeltjes niet van generatie op generatie overgedragen. De kans dat medewerkers geïnfecteerd raken met gg-EIAV door werkzaamheden met nakomelingen van de getransduceerde kippen acht de COGEM gezien bovenstaande gegevens verwaarloosbaar klein.

Daarnaast is het de vraag of de replicatiedeficiënte lentivirale vectoren door recombinatie met een in de kip aanwezig wildtype lentivirus, replicatiecompetent kunnen worden. Ook zou de aanwezigheid van wildtype lentivirus kunnen resulteren in de mobilisatie of complementatie van de geïntegreerde lentiviralevector. In de afgelopen jaren zijn er vele typen aviaire retrovirussen geïdentificeerd.²⁰ Echter, tot op heden zijn er in de wetenschappelijke literatuur nog nooit aviaire lentivirussen gerapporteerd. Daarom is de COGEM van mening dat de kans zeer klein is dat kippen wildtype lentivirussen kunnen bevatten. Daarnaast is er gebruik gemaakt van een SIN-vector. Door de deletie van de U3 regio in deze SIN-vector is volledige reverse transcriptie van het virale genoom niet meer mogelijk. Hierdoor kan de vector niet meer gemobiliseerd worden door een superinfectie met een wildtype lentivirus.

Hoewel kippen besmet kunnen zijn met verschillende aviare retrovirussen, acht de COGEM het om verschillende redenen onwaarschijnlijk dat de gg-EIAV vector in een retrovirusdeeltje opgenomen zal worden. De homologie tussen EIAV en de aviare retrovirussen is laag. Bovendien is het EIAV packagingsignaal onvoldoende geschikt voor een efficiënte packaging van de gg-EIAV vector in een retrovirus deeltje.

Gebaseerd op bovenstaande overweging acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat complementatie en mobilisatie van de vector optreedt en dat er door recombinatie van gg-EIAV met een aviair retrovirus een RCL kan ontstaan.

Advies

Op dit moment is het nog niet precies bekend welk transgeen materiaal door het Roslin instituut beschikbaar wordt gesteld voor de voorgenomen werkzaamheden. De COGEM acht het

hoogstwaarschijnlijk dat het materiaal afkomstig zal zijn van nakomelingen van de *in ovo* getransduceerde kippen. Echter, omdat hier geen zekerheid over bestaat en de COGEM de werkzaamheden met de *in ovo* getransduceerde kippen of cellen en weefsels van deze generatie kippen anders beoordeeld dan werkzaamheden met nakomelingen van deze eerste generatie transgene kippen is het advies in twee hierna volgende delen opgesplitst.

Inschaling van werkzaamheden met de in ovo getransduceerde kippen of met cellen of weefsels van deze kippen

In de aangeleverde informatie wordt niet vermeld of de virusbatch getest is op de aanwezigheid van RCL. Gebaseerd op de ervaringen met het gebruikte productiesysteem acht de COGEM voor de eerste generatie transgene kippen de kans klein dat er RCL aanwezig is. Zij kan dit evenwel niet uitsluiten. Op basis van de indeling van EIAV in pathogeniteitsklasse 2 adviseert zij derhalve de werkzaamheden met de eerste generatie transgene kippen of cellen en weefsels afkomstig van deze kippen in te schalen op DM-II of ML-II niveau.

Inschaling van werkzaamheden met nakomelingen van de in ovo getransduceerde kippen of met cellen of weefsels van deze latere generatie transgene kippen

Aangezien lentivirale vectordeeltjes niet van generatie op generatie overgedragen worden en gegeven de halfwaardetijd van retrovirussen en het tijdsbestek tussen transductie van de eieren en het geslachtsrijp worden van de hanen en hennen acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de nakomelingen van de *in ovo* getransduceerde dieren vrije vectordeeltjes of RCL zullen bevatten en uitscheiden. De COGEM is derhalve van mening dat alle nakomelingen van de getransduceerde dieren zonder aanvullende voorwaarden gehuisvest kunnen worden op D-I niveau. Conform het eerder afgegeven generieke advies adviseert de COGEM de preparatie en analyse van weefsels en cellen afkomstig van de transgene kippen die op D-I niveau zijn gehuisvest op ML-I inperkingsniveau uit te voeren.

Gezien bovenstaande overweging en het feit dat de vector is gebaseerd op EIAV, een virus dat niet voorkomt in de mens, acht de COGEM de kans op verspreiding van de vector via de werknemer verwaarloosbaar klein. De COGEM is derhalve van mening dat de veiligheid van mens en milieu niet in het geding komt door het meten van de fluorescentie van eieren en kiemschijven buiten inperking. Zij adviseert daarbij de standaard ML-I werkvoorschriften te hanteren en voegt daar de volgende aanvullend voorschriften aan toe:

- het materiaal in kweekplastics bevindt zich tijdens het transport in luchtdicht afgesloten containers,
- de petrischaal met het transgene materiaal is alleen open tijdens de meting,
- voordat de petrischaal wordt geopend, wordt deze in een plastic bak geplaatst zodat eventueel gemorst materiaal wordt opgevangen
- er vindt buiten inperking geen manipulatie plaats van het materiaal.

Conclusie

Op bovengenoemde inperkingsniveau's en onder navolging van gestelde voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu die verbonden zijn aan werkzaamheden met (nakomelingen van) de *in ovo* getransduceerde kippen en cellen of weefsels van deze kippen verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Desrosiers RC (2001). Nonhuman Lentiviruses. In: *Fields Virology*, Edited by: Knipe DM & Howley PM. Philadelphia: 2095-2121
2. Covalada L *et al.* (2010) EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine and chemokine response in infected macrophages *Virology* 397:217-223
3. Het voedselagentschap. Equine infectieuze anemie (EIA). Internet: www.afsca.be/sp/sa-ane-equine/anemie-equine_nl.asp (16 september 2010)
4. APHIS (2003). Equine Infectious Anemia. Factsheet april 2003
5. Centre for food security and public health (2005). Equine infectious anemia. Iowa state University
6. Soortenbank (2010). Internet: www.soortenbank.nl. 16 september 2010
7. Delenda C (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *Journal of gene medicine* 6: S125-S138
8. Romano G (2005). Current development of lentiviral-mediated gene transfer. *Drug News and Perspectives* 18: 128-134
9. Verhoeven E en Cosset FL (2004). Surface-engineering of lentiviral vectors. *Journal of gene medicine* 6: S83-94
10. McGrew MJ *et al.* (2004). Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO reports* 5: 728-733
11. Miyoshi H *et al.* (1998) Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.* 72:8150-8157
12. Zufferey R *et al.* (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J. Virol.* 72: 9873-9880
13. Kappes JC & Wu X (2002). Safety consideration in vector development *Somat. Cell Mol. Genet.* 126: 147-158
14. Mitrophanous KA *et al.* (1999). Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector. *Gene Ther.* 6: 1808-1818
15. COGEM (2008). Classificatie *Equine infectious anemia virus*. COGEM advies CGM/080205-01
16. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen . COGEM advies CGM/060420-04
17. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
18. Miskin J *et al.* (2006) A replication competent lentivirus (RCL) assay for equine infectious anaemia virus (EIAV)-based lentivirus vectors. *Gene Ther.* 13:196-205
19. Higashikawa F & Chang LJ (2001) Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* 280: 124-131
20. Linial ML *et al.* (2005) Retroviridae. In: *Virus Taxonomy*. Edited By Fauquet CM *et al.* Elsevier Academic Press. 421-440