



Commissie Genetische Modificatie

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

Aan de Staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening
en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Ministerie van VROM
Postbus 30945
2500 GX DEN HAAG

Uw kenmerk	Uw brief van	Kenmerk	Datum
IM 04-001.co1	30-08-2004	CGM/040928-03	28 september 2004

Onderwerp
Advies IM 04-001

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de ontwerpbeschikking IM 04-001, getiteld 'Evaluation of the safety of a bivalent gene deleted live vaccine of Feline Herpes Virus, administered as an intranasal vaccination to cats', van Pfizer Animal Health te Kent, Verenigd Koninkrijk, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van een veldproef naar de werking van een genetisch gemodificeerd vaccin dat is gebaseerd op het *Feline herpes virus* type 1 (FHV-1) en waarin genen van het *Feline immunodeficiency virus* (FIV) zijn gekloneerd. Het vaccin zal in kattenfokkerijen aan huiskatten via de neus worden toegediend. De resultaten van deze proef zullen gebruikt worden voor de registratieprocedure van het vaccin in Europa. Vergelijkbare experimenten hebben al in de Verenigde Staten plaatsgevonden. Het gemodificeerde vaccin kan alleen katachtigen infecteren. Na infectie zijn geen nadelige effecten te verwachten, mede omdat het hier een verzwakt virus betreft. De combinatie van het FHV met genen afkomstig uit FIV leidt niet tot een verhoogde virulente, verandering in de gastheerbereik of weefselspecificiteit, dan wel een ziektebeeld bij geïnfecteerde katten. Bij een mogelijke verspreiding van de recombinante virussen in het milieu zijn geen schadelijke effecten te verwachten op de kattenpopulatie of individuele dieren. De COGEM is van mening dat de risico's voor mens en milieu bij uitvoering van de voorgenomen experimenten verwaarloosbaar klein zijn en dat aanvullende risico-beheersingmaatregelen niet noodzakelijk zijn.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'B.C.J. Zoeteman', with a long horizontal flourish extending to the right.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Titel: Veldproef naar de werking van een genetisch gemodificeerd vaccin tegen *Feline immunodeficiency virus* (FIV) infectie bij katten

COGEM advies: CGM/040928-03

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van een veldproef naar de werking van een genetisch gemodificeerd vaccin dat is afgeleid van het *Feline herpes virus* type 1 (FHV-1; *Felid herpes virus* 1, FeHV-1) en waarin genen van het *Feline immunodeficiency virus* (FIV) zijn gekloneerd. Het vaccin zal aan huiskatten in kattenfokkerijen worden toegediend. Zowel FHV-1 als FIV komen uitsluitend voor bij katachtigen (*Felidae*), waar ze infecties en ontstekingen aan onder andere neusholten, luchtwegen, en in het geval van FHV-1 ogen, veroorzaken.

Het doel van de veldproef is om de veiligheid van het FHV-1/FIV vaccin na vaccinatie van katten onder veldcondities te testen. Hiertoe worden 40 tot 1000 katten van tenminste 8 weken oud, nasaal (in de neus) gevaccineerd. Het vaccin zal twee maal worden toegediend en de toe te dienen dosis zal niet meer dan 10^7 infectieuze virusdeeltjes bevatten. De katten zullen tot twee weken na de laatst toegediende dosis worden geobserveerd en bemonsterd. De monsters zullen worden geanalyseerd in een laboratorium in het Verenigd Koninkrijk. Vergelijkbare experimenten hebben reeds plaatsgevonden in de Verenigde Staten. De resultaten van de onderhavige veldproef zullen gebruikt worden voor de registratieprocedure van het vaccin in Europa.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft nog niet eerder over een vergelijkbaar experiment als deze veldproef geadviseerd. De commissie heeft wel op 24 juni 2003 geadviseerd over experimenten met het onderhavige FHV-1/FIV vaccin in het kader van een ingeperkt gebruik aanvraag (1). Op basis van de classificatie van FHV-1 en FIV in pathogeniteitsklasse 2 heeft de COGEM destijds geadviseerd handelingen met het cellen en weefsels in associatie met het vaccin in te schalen op CI-niveau (ML-II). Voor handelingen met katten in associatie met het vaccin werd een inschaling op DII-niveau geadviseerd.

Milieurisico-analyse

Bij de risicobeoordeling van introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's), zoals die door de COGEM wordt uitgevoerd, wordt gekeken naar de effecten die het ggo kan hebben op mens en milieu (waarbij de mens als integraal

onderdeel van het milieu wordt beschouwd).

Onder risico wordt verstaan de combinatie van de gevolgen van een gevaar en de kans dat deze gevolgen zich kunnen voordoen. De mogelijke schadelijke effecten van (toepassing van) een ggo worden vergeleken met die van het ongemodificeerde organisme (de zogenaamde basislijn) waaruit het ggo is afgeleid.

De uitgangspunten en de methodiek van de milieurisicobeoordeling is in de EU richtlijn 2001/18 en de bijbehorende bijlagen beschreven. Hierin is vastgelegd dat bij de milieurisicobeoordeling zowel gekeken wordt naar mogelijk directe als indirecte schadelijke effecten van het ggo. Om tot een risico-inschatting te komen worden de volgende stappen doorlopen: de identificatie van kenmerken die schadelijke effecten kunnen hebben; de evaluatie van mogelijke gevolgen van het mogelijk optreden van schadelijke effecten; evaluatie van de kans op het optreden van mogelijke schadelijke effecten; schatting van het risico dat aan elk bepaald kenmerk van het ggo is verbonden; bepaling risicomanagementmaatregelen; en bepaling algehele risico van het ggo.

In het kader van onderhavige aanvraag kijkt de COGEM naar de risico's die zijn verbonden aan het introduceren van de genetisch gemodificeerde virussen rFHV Δ tkFIV env en rFHV Δ tkFIV gag in het milieu. De mogelijke nadelige effecten van deze introductie worden bestudeerd waarbij de effecten van het wildtype FHV als basislijn genomen wordt. Concreet betekent dit dat gekeken wordt naar de mogelijk schadelijke effecten van de recombinante virussen (waarbij onder meer de mogelijkheid van recombinitie en de gevolgen daarvan wordt bekeken), de kans op verspreiding van deze virussen in het milieu en de effecten die door de mogelijke verspreiding teweeg gebracht kunnen worden. Om deze aspecten te kunnen beoordelen wordt een aantal factoren in ogenschouw genomen: de eigenschappen van het gastheerorganisme waarin de transgenen zijn ingebracht, de eigenschappen van het organisme waaruit de ingebrachte genen afkomstig zijn (donororganisme), de kenmerken van de ingebrachte transgenen, de mogelijke effecten van deze genen, en de kenmerken van het ggo.

Het gastheerorganisme (FHV-1)

Als basis voor het vaccin wordt gebruik gemaakt van het *Feline herpes virus type 1* (FHV-1). FHV-1 is een dubbelstrengig DNA-virus dat behoort tot het genus *Alphaherpesvirinae* van de familie van de *Herpesviridae*. Het virus komt wereldwijd voor en kan alleen katachtigen (huiskatten) infecteren (2). Infectie vindt doorgaans plaats door inademing van het virus of door opname via de mond. FHV-1 infecteert hoofdzakelijk de cellen van de bovenste luchtwegen en van de geslachtsorganen. Daarnaast blijkt een gevoeligheid voor FHV-1 infectie van cellen in de lymfeklieren van het halsgebied, in de tonsillen, en kan FHV-1 T-lymfocyten infecteren. Geïnfecteerde dieren vertonen luchtweginfecties en oogontstekingen (2). Replicatie

van het FHV-1 vindt voornamelijk plaats in de mucosale oppervlakten bij de neus en de ogen (3). Gedurende 1 tot 3 weken na infectie wordt het virus uitgescheiden vanuit ogen, neus en mond (niezen en hoesten). De meeste katten herstellen na één tot twee weken. Na deze periode blijft het virus in 80% van de katten levenslang latent aanwezig in de zenuwknopen van het geïnfecteerde weefsel. Door stress kan het FHV-1 gereactiveerd en uitgescheiden worden (3).

Het donororganisme (FIV) en kenmerken van de transgenen (env en gag)

In afzonderlijke FHV-1 stammen worden twee genen (*env* en *gag*) afkomstig van het *Feline immunodeficiency virus* (FIV) geïnserteerd. FIV is een retrovirus (familie *Retroviridae*, genus *Lentivirus*) dat immunodeficiëntie veroorzaakt bij katachtigen. Het virus is verwant aan het humane aidsvirus (HIV), en wordt gebruikt als modelsysteem voor HIV-onderzoek en daarom ook wel katten AIDS virus genoemd. Voor zover bekend kunnen mensen of andere diersoorten niet geïnfecteerd worden door FIV. Bij blootstelling van verscheidene humane, honden of katten cellen, was het virus alleen in staat om feline cellen te infecteren (4; 10). FIV-infecties vinden plaats in het beenmerg, lymfeklieren, thymus en milt, waarbij hoofdzakelijk de T-lymfocyten worden geïnfecteerd (5). Na een lange periode waarin geen symptomen waar te nemen zijn, ontstaan door het niet functioneren van het immuunsysteem infecties van opportunistische pathogenen die uiteindelijk tot de dood leiden. Infectie met FIV vindt doorgaans plaats via vecht- en bijtwonden. Ook vindt overdracht via seksueel contact en in beperkte mate via speeksel plaats (6; 7).

FIV_{env} gen.

Het FIV_{env} gen codeert voor virale glycoproteïnes die aanwezig zijn in het membraan dat het FIV virusdeeltje omsluit. Deze geglycosyleerde eiwitten spelen een rol bij de aanhechting aan, en de infectie van FIV van de gastheercel. Door de insertie van het *env* gen in de FHV-1 is het theoretisch mogelijk dat het Env eiwit tot expressie komt op de buitenkant van het FHV-virusdeeltje, waardoor een verandering van het spectrum van infecteerbare weefsels (weefseltropisme) kan optreden. Uit de door de aanvrager aangeleverde gegevens blijkt echter dat een verandering van weefseltropisme niet optreedt. Een verandering in gastheerbereik van het recombinante virus is eveneens zeer onwaarschijnlijk omdat zowel FHV-1 als FIV alleen katachtigen kunnen infecteren.

FIV_{gag} gen.

Het *gag* gen codeert voor structurele eiwitten van het FIV. Het *gag* gecodeerde precursor-eiwit wordt hiertoe opgesplitst door een protease in meerdere functionele eiwitten. Deze eiwitten spelen een rol bij het inkapselen van het retrovirale RNA en de capsidvorming. Het Gag eiwit speelt geen rol bij de infectie van de gastheercel. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de expressie van het Gag-eiwit in FHV vectoren

plaatsvindt, maar dat het Gag ‘precursor’ eiwit ondanks de aanwezigheid van het benodigde protease niet omgezet wordt in functioneel eiwit (8; 9).

Gezien het feit dat geen functionele eiwitten gevormd worden en dat de Gag eiwitten geen rol spelen bij de infectie van de cel is een verandering van weefsel-tropisme van het recombinante virus onwaarschijnlijk. De aanvrager heeft hiernaast experimenten uitgevoerd die aantonen dat een verandering in weefsel-tropisme niet optreedt. Zoals hierboven vermeld is van zowel FHV-1 als van FIV bekend dat hun gastheerspecificiteit beperkt is tot de katachtigen waardoor een kans op verbreding van de gastheerspecificiteit van het recombinante virus zeer onwaarschijnlijk is.

Aspecten van het ggo

Het vaccin is samengesteld uit twee afzonderlijke genetisch gemodificeerde FHV-1 stammen (1:1) die respectievelijk het *env* en *gag* gen van FIV bevatten en tot expressie brengen (rFHV Δ tkFIV*env* en rFHV Δ tkFIV*gag*). Deze genen zijn geïnserteerd in de plaats van het thymidine kinase (*tk*) gen van FHV-1 (5; 8), waardoor het *tk* gen inactief wordt. Verschillende onderzoeken hebben aangetoond dat het *tk* gen bijdraagt aan de virulentie van het virus (3). Na vaccinatie in katten met het onderhavige recombinante virus is een verminderde virulentie geconstateerd (6). De geïnfekteerde dieren vertoonden geen ziektesymptomen, temperatuurverhoging of gewichtsverlies.

De recombinante virussen zijn replicatie-competent. Het *tk* gen is niet essentieel voor replicatie van FHV, en ook de insertie van de *gag* en *env* genen is niet van invloed op de replicatie.

Gerapporteerd is dat shedding van FHV-recombinanten gedurende een periode van 17 dagen na toediening optreedt via secretie uit oog, oor en neus (8). Experimenten die door de aanvrager zijn uitgevoerd met gevaccineerde en niet-gevaccineerde katten tonen aan dat shedding en overdracht van de verschillende virussen 14 tot 27 dagen na vaccinatie plaatsvindt. De mate van shedding in de experimenten was overigens gering aangezien slechts bij één van de tien niet-gevaccineerde contact-dieren een geringe immuunrespons optrad. De in de geïnfekteerde katten teweeggebrachte immuunrespons leidt uiteindelijk tot onderdrukking van de replicatie van het virus en stopzetting van de shedding (8).

Zoals eerder beschreven kan het wildtype FHV-1 in katten na infectie latent aanwezig blijven waarna het door stressinvloeden gereactiveerd en uitgescheiden kan worden. De aanvrager toont resultaten van experimenten waaruit blijkt dat reactivatie van de vaccinstammen in katten niet is waargenomen. Dit is het geval zowel onder ‘normale’ omstandigheden als onder omstandigheden waarbij het immuunsysteem van de katten werd onderdrukt.

Voor het geattenueerde karakter van het virus is het van belang dat het vaccin genetisch stabiel blijft en dus de inactivatie van het *tk* gen wordt behouden. Om dit aan te tonen heeft de aanvrager experimenten uitgevoerd waaruit blijkt dat het vaccin

na vijf passages in de katten stabiel is. De inactivatie van het *tk* gen kan ook opgeheven worden door recombinatie met het FHV-1 virus. Dit kan alleen optreden als één cel door zowel het wildtype FHV-1 als een vaccinstam geïnfecteerd wordt, bijvoorbeeld als de kat een FHV-1 infectie doormaakt ten tijde van de vaccinatie. Bij een dergelijke recombinatie zal de vaccinstam het *tk* gen verkrijgen maar het geïnserteerde gen verliezen waardoor het wildtype virus ontstaat. Als gevolg van de recombinatie zal het FHV-1 virus het FIV-*env* of *-gag* gen ontvangen van het vaccinvirus, maar zal daardoor tevens zijn *tk* gen kwijtraken waardoor het sterk geattenuëerd wordt. Er verandert hiermee niets aan de uitgangssituatie.

Thymidine kinase genen komen algemeen voor bij zowel herpesvirussen als andere organismen. De homologie tussen het katten cellulaire *tk* gen en het FHV gen is echter bijzonder laag. Ook de homologie tussen de *tk* genen van de verschillende herpesvirussen is zeer beperkt. Gezien de lage overeenkomsten in sequenties is het bijzonder onwaarschijnlijk dat de vaccinstammen hersteld kunnen worden door recombinatie met cellulaire of andere virale *tk* genen.

Overwegingen en advies

In de voorgenomen experimenten wordt gebruik gemaakt van zogenaamde recombinante vaccinstammen, waarbij in het FHV virus het *tk* gen vervangen is door het FIV*env* of FIV*gag* gen. Met het gebruik van recombinante virussen is een aantal mogelijke risico's te voorzien. De virussen kunnen in het algemeen tot onverwachte effecten leiden doordat virulentie, weefseltropisme of gastheerbereik zijn veranderd. De virussen kunnen zich mogelijk in het milieu verspreiden. En bij een dergelijke verspreiding van de virussen wordt mogelijk een onbedoeld effect in het milieu veroorzaakt.

In de hier voorgelegde experimenten wordt gebruik gemaakt van een mengsel van FHV vectoren (FHV Δ *tk*) waarbij het *tk* gen verwijderd en vervangen is door het FIV*env* of FIV*gag* gen. Door de afwezigheid van het *tk* gen is de virulentie van de FHV Δ *tk* vector sterk verminderd (geattenuëerd) ten opzichte van het wildtype virus (8). De virulentie zou kunnen toenemen als de afwezigheid van het *tk* gen wordt opgeheven door recombinatie met wildtype FHV. Hiertoe zou een gelijktijdige infectie met wildtype en recombinant virus moeten optreden. Dieren die symptomen vertonen van een mogelijke FHV infectie worden uitgesloten van de experimenten. Indien dieren gedurende de proeven dubbel geïnfecteerd raken is de mogelijkheid van homologe recombinatie aanwezig. Echter een dergelijke recombinatie zal leiden tot het ontstaan van een wildtype virus. Een andere mogelijkheid voor het opheffen van de afwezigheid van het *tk* gen is een terugmutatie. Omdat de vector verkregen is door een deletie van het *tk* gen, is reversie uitgesloten. Ook herstel door recombinatie met een *tk* gen aanwezig in de cel van de gastheer, de kat, is zeer onwaarschijnlijk gezien de lage sequentie homologie. De COGEM is verder van mening dat afdoende is

aangetoond dat de aanwezigheid van het FIV_{env} gen en FIV_{gag} gen niet leidt tot een verhoogde virulentie, een veranderend weefseltropisme noch tot een veranderd gastheerbereik.

Samenvattend is de COGEM van mening dat bij toepassing van het vaccin geen schadelijke effecten te verwachten zijn.

Betreffende de kans op verspreiding in het milieu van de vaccinstammen en de mogelijke effecten hiervan kan het volgende opgemerkt worden. Uit de door de aanvrager geleverde gegevens blijkt dat shedding (uitscheiding) van virus bij de meeste dieren (70-80%) stopt binnen 15 dagen na de laatste toediening maar dat bij een enkel dier uitscheiding kan plaatsvinden tot 27 dagen na vaccinatie. Hoewel de uitgescheiden dosis laag is bleek dat tenminste één niet-gevaccineerde kitten, dat in hetzelfde verblijf aanwezig was als de gevaccineerde katten, het vaccinvirus had opgenomen. Hieruit blijkt dat ondanks het geattenuerde karakter van de recombinante virussen verspreiding in het milieu mogelijk is en waarschijnlijk zal optreden.

De effecten van een mogelijke verspreiding zijn zeer beperkt. Gezien de eigenschappen van het donororganisme en de ingebrachte genen kunnen de virussen zich alleen verspreiden onder katachtigen en niet naar andere diersoorten. Daarbij zijn, mede gezien het geattenuerde karakter van de virussen en de eigenschappen van ingebrachte genen, geen schadelijke effecten op de kattenpopulatie of de dieren zelf te verwachten. Naar de mening van de COGEM is als enig effect te voorzien dat onbedoeld geïnfecteerde katten een immuunrespons tegen FIV zullen vertonen.

FHV en FIV zijn algemeen voorkomende virussen in de kattenpopulatie. Verspreiding van de recombinante FHV stammen en de daarin aanwezige sequenties brengt inziens van de COGEM daarom geen grotere risico's met zich mee voor recombinitie met andere virussen dan de thans bestaande kansen op recombinitie tussen wildtype virussen.

Gezien het bovenstaande is de COGEM van mening dat bij verspreiding van de onderhavige vaccinstammen mogelijk kan optreden maar dat hiervan geen nadelige effecten op mens en milieu te verwachten zijn.

Met betrekking tot de risicobeheersmaatregelen zoals die zijn opgenomen in de, door het ministerie van VROM opgestelde, conceptbeschikking merkt de COGEM het volgende op. In de conceptbeschikking wordt gesteld dat, om na vaccinatie verspreiding van het genetisch gemodificeerde FVH-1 naar niet gevaccineerde katten te voorkomen, de katten tot tenminste twee weken na de laatste toediening van het vaccin apart gehuisvest moeten worden. Tevens wordt het volgende aanvullende voorschrift opgelegd: "De eerste tien katten van het experiment moeten gecontroleerd worden op shedding van de vaccinstammen. Indien bij deze dieren op dag twaalf, dertien of veertien na de laatste toediening nog shedding wordt waargenomen, is het niet toegestaan een kat buiten het afgezonderde verblijf te huisvesten. In dit geval mag

de afgezonderde huisvesting pas opgeheven worden indien bij alle positief bevonden katten drie achtereenvolgende dagen geen shedding meer wordt waargenomen.”

De COGEM is van mening dat deze voorschriften enerzijds overbodig en anderzijds methodologisch onjuist zijn. Uit de door de aanvrager geleverde gegevens blijkt dat shedding kan optreden. Uit deze gegevens blijkt dat shedding geen continu proces is maar onregelmatig verloopt en onverwachts kan hervatten na perioden langer dan drie dagen waarbij geen shedding is aangetoond. Verder worden slechts tien katten getest. Gezien het grote aantal katten (maximaal 1000) die in de proef worden opgenomen is het aantal geteste katten statistisch insignificant en geeft geen waarborg dat shedding bij de gevaccineerde katten buiten de vastgestelde periode niet zal plaatsvinden.

Nog belangrijker is dat bij de voorgeschreven maatregelen voorbij wordt gegaan aan het feit dat shedding en verspreiding van het vaccin geen risico's voor mens en milieu inhoudt. Zoals eerder gesteld zijn er geen nadelige effecten te verwachten van verspreiding van de virussen. Voorschriften om verspreiding tegen te gaan, die ook nog ineffectief zijn, creëren een vorm van onnodige schijnzekerheid waarmee de maatschappij noch de uitvoerders van de experimenten gediend zijn.

Concluderend is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu van de aangevraagde veldproef naar de werking van een genetisch gemodificeerd FIV-FHV vaccin verwaarloosbaar klein zijn en dat aanvullende risicobeheersingmaatregelen betreffende de afzondering van gevaccineerde katten onnodig zijn.

Referenties

1. COGEM advies CGM/030624-01. Biologische karakterisatie van *Feline herpes virus* als vector voor *Feline immunodeficiency virus* (FIV) genen
2. Andrew SE (2001). Ocular manifestations of feline herpesvirus. *Journal of Feline Medicine & Surgery* **3**: 9-16
3. Nunberg JH, Wright DK, Cole GE, Petrovskis EA, Post LE, Compton T, Gilbert JH (1989). Identification of the thymidine kinase gene of feline herpesvirus: use of degenerate oligonucleotides in the polymerase chain reaction to isolate herpesvirus gene homologs. *Journal of Virology* **63**: 3240-3249
4. Klimatcheva E, Rosenblatt JD, Planelles V (1999). Lentiviral vectors and gene therapy. *Frontiers in Bioscience* **4**: 481-496
5. Rogers, A. B., Mathiason, C. K., and Hoover, E. A. (2002). *Am J Pathol* **161**, blz. 1143-1151.
6. Pedersen NC, Yamamoto JK, Ishida T, Hansen H (1989). Feline Immunodeficiency Virus Infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **21**: 111-129
7. Hartmann K (1998). Feline immunodeficiency virus infection: an overview. *The veterinary journal* **155**: 123-137
8. Sato E, Miyazawa T, Nishimura Y, Ikeda Y, Kawakami K, Mochizuki M, Yokoyama N, Maeda K, Fujita K, Kohmoto M, Takahashi E, Mikami T (2001). Further development of a recombinant feline herpesvirus type 1 expressing the Gag protein of feline immunodeficiency virus. *Archives of Virology* **146**: 379-387.
9. Sato E, Yokoyama N, Maeda K, Inoshima Y, Kohmoto M, Ikeda Y, Miyazawa T, Mikami T (1998). Construction of a recombinant feline herpesvirus type 1 expressing Gag precursor protein of feline immunodeficiency virus. *Archives of Virology* **143**: 453-466
10. Yamamoto JK, Sparger E, Ho EW, Andersen PR, O'Connor TP, Mandell CP, Lowenstine L, Munn R, Pedersen NC (1988). Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *Am J Vet Res.* **49**:1246-58.