

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J. J. Atsma
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 11 juni 2012
KENMERK CGM/120611-01
ONDERWERP Advies: introductie milieu kippenvaccin Innovax-ILT

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een vergunningsaanvraag betreffende de introductie in het milieu van het kippenvaccin Innovax-ILT van Intervet International BV, deelt de COGEM u het volgende mee.

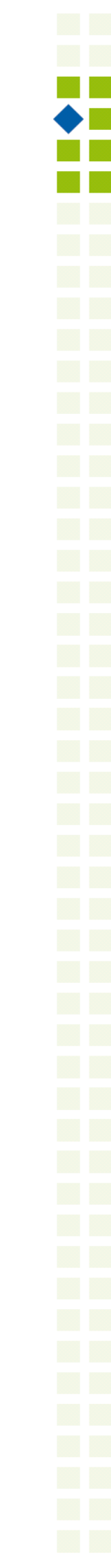
Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over een veterinaire studie bij kippen met genetisch gemodificeerd (gg) *Meleagrid herpesvirus 1* (MeHV-1). In de virusstam FC-126 zijn twee glycoproteïnen van het *Gallid herpesvirus 1* ingebracht. De op deze wijze verkregen gg-virusstam HVT/ILT-138 is ontwikkeld om pluimvee (met name legkippen) te beschermen tegen infectieuze laryngotracheïtis (ILT) en de ziekte van Marek (MD). HVT/ILT-138 is als vaccin in diverse landen buiten de EU onder de naam Innovax-ILT geregistreerd.

De vaccinstam waarop Innovax-ILT is gebaseerd (FC-126), is niet pathogeen en wordt al meer dan 30 jaar als vaccin tegen MD gebruikt. FC-126 kent een lange historie van veilig gebruik. Van Innovax-ILT zijn buiten de EU in de periode 2007-2010 meer dan 1,1 miljard doses verkocht. De aanvrager geeft aan dat er gedurende deze periode geen schadelijke effecten zijn waargenomen.

Veiligheidsstudies hebben aangetoond dat HVT/ILT-138 ten opzichte van ouderstam FC-126 niet veranderd is in biologische eigenschappen, gastheerbereik en pathogeniteit. Daarnaast acht de COGEM de kans dat HVT/ILT-138 zich bij de voorgenomen werkzaamheden in het milieu kan verspreiden verwaarloosbaar klein. Zij merkt echter op dat experimentele gegevens betreffende de moleculaire karakterisatie in het dossier ontbreken. Daarnaast kan zij het 'Periodic Safety Update Report' niet verifiëren omdat een essentieel onderdeel hiervan ontbreekt.

Samengevat verwacht de COGEM dat de risico's voor mens en milieu bij deze veldstudie met Innovax-ILT onder de voorgenomen werkvoorschriften vermoedelijk verwaarloosbaar klein zijn. Het dossier is echter onvolledig omdat bepaalde onderbouwende gegevens ontbreken. De COGEM acht aanlevering van deze aanvullende informatie noodzakelijk alvorens zij tot een definitief eindoordeel kan komen.



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

Hoogachtend,



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

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

Introductie in het milieu van een recombinant herpesvirus vaccin tegen laryngotracheïtis en de ziekte van Marek

COGEM advies CGM/120611-01

Inleiding

De COGEM is om advies gevraagd over de introductie in het milieu van het recombinant kippenvaccin Innovax-ILT. Innovax-ILT is ontwikkeld om pluimvee (voornamelijk legkippen) te beschermen tegen infectieuze laryngotracheïtis (ILT) en de ziekte van Marek (MD), en is in diverse landen buiten de EU geregistreerd. De vergunningsaanvraag is ingediend door Intervet International BV. Ter voorbereiding voor de aanvraag van een Europese marktregistratie, wil de aanvrager een veldproef uitvoeren bij een pluimveehouderij in Oost-Gelderland.

Ziekte van Marek

MD komt voor bij pluimvee en wordt gekenmerkt door een woekering van witte bloedcellen (T-cel lymfoom) waardoor het zenuwstelsel aangetast wordt. De ziekte gaat ondermeer gepaard met verlamningsverschijnselen en kent een acute en latente fase.^{1,2}

MD wordt veroorzaakt door *Gallid herpesvirus 2* (GaHV-2), ook bekend onder de naam Marek's disease virus (sero)type 1 (MDV-1) of Marek's disease virus (MDV). GaHV-2 is een dubbelstrengs DNA virus en behoort tot de familie *Herpesviridae*, de subfamilie *Alphaherpesvirinae*, en het genus *Mardivirus*.³

Kippen worden beschouwd als de natuurlijke gastheer van GaHV-2, maar ook kwartels, kalkoenen en fazanten kunnen geïnfecteerd worden.⁴ Het virus is zeer infectieus. Bij niet gevaccineerde populaties kan de morbiditeit en mortaliteit oplopen tot 90%.^{1,2} Uitscheiding van het virus vindt plaats via de veerfollikels, verspreiding van het virus via huidschilfers en besmette mest.⁴ De virusdeeltjes kunnen langere tijd in het milieu (stof, mest) overleven.⁴ Besmetting vindt plaats via de ademhalingswegen waarbij infectie optreedt van de epitheelcellen en macrofagen van de onderste luchtwegen.^{1,4} Vervolgens verspreidt het virus zich naar de lymfoïde organen zoals de thymus, de bursa van Fabricius en milt. In de daarop volgende latente fase verspreidt het virus zich naar de epitheliale cellen van ingewanden en huid.^{1,4} Uit de literatuur zijn geen gegevens bekend dat het virus pathogeen is voor zoogdieren. Experimenteel onderzoek heeft aangetoond dat GaHV-2 niet kan repliceren in zoogdiercellen (mens, hamster, hond, konijn, rat, rund) of in zoogdieren (hamster, klauwaap, rat).^{5,6}

Infectieuze laryngotracheïtis

ILT komt specifiek voor bij kippen en wordt gekenmerkt door kortademigheid en het ophoesten van bloed (acute fase). De verwekker, *Gallid herpesvirus 1* (GaHV-1), infecteert de bovenste luchtwegen.¹ Na de acute fase volgt een latente fase waarbij het virus zich nestelt in het centrale zenuwstelsel, in het bijzonder in de trigeminale ganglia (drielingzenuw).¹ GaHV-1, ook bekend als Infectious laryngotracheïtis virus (ILTV), behoort eveneens tot de familie *Herpesviridae*,

subfamilie *Alphaherpesvirinae*, en is ondergebracht bij het genus *Iltovirus*.³ GaHV-1 kent een beperkt gastheerbereik. De natuurlijke gastheer van het virus is de kip, maar ook fazanten en pauwen kunnen geïnfecteerd worden.^{1,7} De ernst van de klinische symptomen is afhankelijk van de virulentie van de betreffende stam of isolaat. Mede hierdoor varieert de mortaliteit tussen 0% en 70%. Verspreiding van het virus vindt plaats via de luchtwegen.¹ ILT is zeer besmettelijk.

Innovax-ILT

Innovax-ILT is een recombinant vaccin met als ‘backbone’ virus *Meleagrid herpesvirus 1* (MeHV-1). MeHV-1 behoort tot de familie *Herpesviridae*, subfamilie *Alphaherpesvirinae*, genus *Mardivirus*, en is ook bekend onder de naam Turkey herpesvirus, Herpesvirus of turkeys (HVT) of Marek’s disease virus (sero)type 3 (MDV-3).³ Hoewel MeHV-1 en GaHV-2 nauw verwant zijn, is MeHV-1 niet pathogeen.³ De belangrijkste natuurlijk gastheer is de kalkoen, besmetting vindt plaats via inademing.⁴ Binnen het lichaam verplaatst het virus zich via lymfocyten. Uitscheiding van het virus vindt plaats via de veerfollikels, verspreiding via huidschilfers en besmette mest. Naast de kalkoen kan MeHV-1 ook duiven, kwartels, fazanten en kippen infecteren.⁴ Hoewel in kippen en fazanten wel virusreproductie plaatsvindt, wordt het virus in vergelijking met kalkoenen in veel mindere mate uitgescheiden en vindt verspreiding onder de kippenpopulatie nauwelijks plaats.⁸ Experimentele studies wijzen uit dat MeHV-1 niet kan repliceren in zoogdiercellen (mens, hamster, hond, konijn, rat, rund) of in zoogdieren (klauwaap).^{5,6} MeHV-1 is in staat een immuunrespons tegen GaHV-2 op te wekken. De MeHV-1 stam ‘FC126’ wordt al 30 jaar buiten Europa veelvuldig als vaccinstam tegen MD gebruikt, mede omdat deze apathogene stam zich na vaccinatie niet in de kippenpopulatie verspreidt.^{4,5}

In FC126 zijn de coderende sequenties voor glycoproteïnen gD en gI van GaHV-1 gekloneerd inclusief de endogene promotoren en een gedeeld polyadenyleringssignaal. Het insert is ingebracht in een ‘open reading frame’ met onbekende functie. Glycoproteïnen gD en gI zijn onderdeel van de virusenvelop van GaHV-1. Over de functie van gD in GaHV-1 is weinig bekend. Een fylogenetische analyse op grond van de aminozuursequentie laat zien dat het glycoproteïne een verre verwant is van gD proteïnen van andere *Alphaherpesvirinae*.⁹ *In vitro* karakterisatie van gI van GaHV-1 veronderstelt dat dit eiwit een complex vormt met glycoproteïne gE en betrokken is bij de verspreiding van GaHV-1 naar andere cellen.¹⁰

Met het op bovenstaande wijze verkregen recombinant virus ‘HVT/ILT-138’, zijn embryonale kippefibroblasten geïnfecteerd. Deze fibroblastensuspensie met levend celgeassocieerde virus wordt onder de naam Innovax-ILT bij kippen als vaccin toegepast met als doel een immuunrespons tegen MD en ILT op te wekken.

Innovax-ILT kent een marktregistratie in 9 landen (Canada, Verenigde Staten, Argentinië, Colombia, Costa Rica, Peru, Filipijnen, Nepal en Thailand). Van het vaccin zijn in de periode van 2007-2010 over de gehele wereld, maar buiten de EU, meer dan 1,1 miljard doses verkocht. De aanvrager geeft aan dat er gedurende deze periode geen schadelijke effecten van het vaccin zijn waargenomen. Ter onderbouwing heeft hij bij de vergunningsaanvraag een ‘Periodic Safety

Update Report' en diverse veiligheidsstudies aangeleverd. De studies en documenten zijn opgesteld door de aanvrager.

Werkzaamheden met Innovax-ILT

De aanvrager geeft aan dat de productie en kwaliteitscontrole van Innovax-ILT plaatsvindt in de Verenigde Staten. De Nederlandse veldstudie met Innovax-ILT zal bestaan uit het vaccineren van groepen van 3.000 eendagskuikens en het bepalen van de veiligheid van het vaccin ten opzichte van een koppel van 3.000 ongevaccineerde eendagskuikens gedurende maximaal 20 weken na vaccinatie. In de studie zullen maximaal 20.000 eendagskuikens geïncubeerd worden. Het vaccin zal subcutaan (vlak onder de huid) aangebracht worden. Op verschillende tijdstippen zullen bloedmonsters afgenomen worden die vervolgens op een andere locatie geanalyseerd worden onder een reeds eerder afgegeven vergunning.¹¹ Om de effectiviteit van het vaccin te testen zal een aantal kippen (al dan niet gevaccineerd met Innovax-ILT) onder laboratoriumcondities besmet worden met virulent GaHV-1 en GaHV-2 eveneens onder een reeds eerder afgegeven vergunning.¹¹ Maximaal 20 weken na vaccinatie zullen de kippen geëuthanaseerd worden en ter destructie worden aangeboden. Eventueel gelegde eieren zullen vernietigd worden. Kadavers en eieren zullen niet in de dierlijke of humane voedselketen terecht komen. Bedrijfsafval zoals mest en strooisel zal verzameld worden in containers en ter verbranding worden afgevoerd. De stal zal gereinigd en gedesinfecteerd worden volgens standaardprocedures en het gedesinfecteerde afvalwater zal vervolgens op het riool geloosd worden.

Eerder COGEM-advies

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over Innovax-ILT of andere op FC126 gebaseerde vaccins. Wel heeft zij in 2002 en 2003 advies uitgebracht over de introductie in het milieu van een op MeHV-1 gebaseerd recombinant vaccin bij kippen met een insertie van het *Newcastle disease virus*. De COGEM concludeerde dat, mits uitgevoerd onder de condities beschreven door de aanvrager, er geen risico's waren voor mens en milieu.^{12,13}

Recent heeft de COGEM advies uitgebracht over herpesvirusvaccins bij lama's. Het betrof een op MeHV-1 gebaseerd recombinant vaccin met een insertie van het *Infectious bursal disease virus*. Dit vaccin kent sinds 2002 een Europese markttoelating voor kippen en is niet pathogeen voor zoogdieren. De COGEM concludeerde dat er voor toepassing bij lama's geen risico's waren voor mens en milieu, mede omdat de vaccinstam niet replicateert in zoogdieren.¹⁴

Overweging

Bij de introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde (gg) virussen zijn voor de milieurisico-analyse verschillende aspecten van belang zoals de moleculaire karakterisatie, biologische eigenschappen, pathogeniteit, uitscheiding door de gastheer en de eventuele overleving en verspreiding van het gg-virus in het milieu. De van belang zijnde milieurisico-aspecten betreffende de recombinante virusstam HVT/ILT-138 waarop het vaccin Innovax-ILT gebaseerd is, worden hieronder puntsgewijze besproken.

Moleculaire karakterisatie

De COGEM acht het van belang dat een te testen recombinant virus in voldoende detail moleculair is gekarakteriseerd zodat op basis van deze informatie met voldoende zekerheid vastgesteld kan worden wat zijn genetische samenstelling is. Op deze wijze kan geverifieerd worden of er naast de ingebrachte eigenschap al dan niet herschikkingen hebben plaatsgevonden of andere sequenties onbedoeld zijn geïnsereerd, en of een te testen recombinant overeenkomt met zijn theoretische beschrijving.

De aanvrager heeft een schematische weergave van HVT/ILT-138 aangeleverd waarin de opbouw van het insert en de insertielocus in het genoom van FC126 wordt aangegeven. Echter, experimentele sequentiegegevens van het insert inclusief de 5'- en 3'-overgang met het genomische DNA van het oudervirus, of een Southern blot die bevestigt dat het insert in betreffend locus geïntegreerd is, zijn niet meegeleverd. Ook zijn geen experimentele gegevens aangeleverd die aantonen hoeveel kopieën van het insert aanwezig zijn, of die laten zien dat er geen herschikkingen of onbedoelde sequenties in het genoom voorkomen ten gevolge van het inbrengen van de insertie.

De COGEM acht het noodzakelijk dat experimentele gegevens aangeleverd worden aan de hand waarvan zij de genetische samenstelling van uitgangsstam FC126 en HVT/ILT-138 met elkaar kan vergelijken, bijvoorbeeld aan de hand van restrictiefragmentanalyses of de sequentie van beide genomen. Daarnaast acht zij het noodzakelijk dat een sequentieanalyse van het insert en de 5'- en 3'-overgang met het genomisch DNA aangeleverd wordt.

De stabiliteit van HVT/ILT-138 is getest door de stam vijf keer in celkweek en kippen te passeren. Aan de hand van een Southern blot en reverse transcription PCR, wordt volgens de aanvrager bevestigd dat er na deze vijf passages één kopie van het gD/gI insert aanwezig is, dat er geen herschikkingen van het insert in het virale genoom hebben plaatsgevonden, en dat transcriptie van het geïnsereerde DNA plaatsvindt. De COGEM merkt op dat in de aangeleverde documentatie een figuur met primer- en restrictiesites ontbreekt, waardoor zij niet kan herleiden wat de te verwachten fragmentgroottes in de diverse analyses zijn. Daarnaast vindt zij de aangeleverde foto's van Southern blot en PCR-analyses onduidelijk. Daardoor kan zij de door de aanvrager gestelde conclusie, dat HVT/ILT-138 stabiel is, niet verifiëren.

Biologische eigenschappen

De aanvrager stelt dat HVT/ILT-138 in vergelijking met de apathogene 'backbone' virusstam MeHV-1 FC126, niet veranderd is in biologische eigenschappen. Hij onderbouwt deze conclusie aan de hand van verschillende veiligheidsstudies en literatuurgegevens.

In een veiligheidsstudie werden eendagskuikens (kippen) met HVT/ILT-138 of FC126 gevaccineerd. Na vaccinatie werden op verschillende dagen diverse organen onderzocht op aanwezigheid van het virus. Er werd geen verschil gevonden in de locatie van het virus in de verschillende organen. De COGEM concludeert dat het weefseltropisme van HVT/ILT-138 in vergelijking met oudervirus FC126 niet is veranderd.

Uit literatuurgegevens is bekend dat het acceptorvirus MeHV-1 en donorvirus GaHV-1 een beperkt gastheerbereik kennen en alleen bepaalde vogelsoorten kunnen infecteren. Aan de hand van een *in vitro* studie toont de aanvrager aan dat HVT/ILT-138 niet in staat is verschillende zoogdiercellijnen (aap, hamster, rund) te infecteren. Bij de COGEM zijn noch uit de literatuur, noch uit de veterinaire praktijk gegevens bekend dat MeHV-1 en GaHV-1 zoogdieren kunnen infecteren. Daarnaast is de COGEM van mening dat de ingebrachte gD en gI donorsequenties (GaHV-1) geen aanleiding geven om te veronderstellen dat een wijziging in het gastheerbereik van FC126 (MeHV-1) is bewerkstelligd. Ook zijn bij de COGEM gedurende de periode dat Innovax-ILT als vaccin wordt toegepast geen meldingen bekend over veranderingen in gastheertropisme. Samengevat acht de COGEM het onwaarschijnlijk dat het gastheerbereik van HVT/ILT138 ten opzichte van FC126 is veranderd.

De aanvrager stelt dat HVT/ILT-138 net als FC126 niet pathogeen is voor kippen en toont aan de hand van verschillende veiligheidsstudies aan dat HVT/ILT-138 veilig is in gebruik. In een vaccinatiestudie bij kippen laat de aanvrager zien dat zowel een enkelvoudige als 10-voudige dosis van Innovax-ILT geen ziekteverschijnselen veroorzaakt. Een vaccinatiestudie met vijf keer *in vitro* en *in vivo* (kip) gepasseerde HVT/ILT-138 virusisolaten veroorzaken eveneens geen ziekteverschijnselen. Een veldstudie waarbij circa 225.000 met Innovax-ILT gevaccineerde en ongevaccineerde kippen met elkaar zijn vergeleken, laten geen significante verschillen in morbiditeit en mortaliteit zien.

Sinds 2007 wordt Innovax-ILT toegepast. In het aangeleverde 'Periodic Safety Update Report' wordt geen melding gemaakt van schadelijke effecten. De COGEM merkt daarbij op dat de meest recente 'Statistical Process Control' (SPC) behorende bij dit 'Periodic Safety Update Report' ontbreekt en wijst er op dat het onduidelijk is of er daadwerkelijk gemonitord is op het optreden van schadelijke effecten.

Samengevat verwacht de COGEM aan de hand van de gegevens uit de literatuur, de ervaringen in het veld en de door de aanvrager aangeleverde experimentele gegevens, dat HVT/ILT-138 in vergelijking met uitgangsstam FC126 niet veranderd is in biologische eigenschappen en pathogeniteit. Zij kan het 'Periodic Safety Update Report' echter niet verifiëren omdat de SPC ontbreekt en geen gegevens over monitoringsstudies zijn aangeleverd.

Recombinatie

Indien er na vaccinatie van kippen recombinatie optreedt van HVT/ILT-138 met een ander virus kunnen verschillende situaties optreden. De inserties gD en gI kunnen deleteren waardoor het niet-pathogene wildtype FC-126 zal ontstaan. Daarnaast zou HVT/ILT-138 de geïnsereerde glycoproteïnen kunnen uitwisselen met andere herpesvirussen. Aangezien hiervoor een cel met beide virussen geïnfecteerd moet zijn, acht de COGEM de kans afwezig dat recombinatie optreedt met een herpesvirus dat een ander gastheerbereik heeft dan vogels. Indien recombinatie van HVT/ILT-138 met een aviari herpesvirus optreedt, zullen de recombinanten niet afwijken van de in het milieu voorkomende natuurlijke varianten. Daarbij is uitwisseling van het geïnsereerde dD en gI van HVT/TLT-138 naar het pathogene GaHV-2 virus zeer onwaarschijnlijk omdat de

insertie geen homologie vertoont met GaHV-2. Als er in het theoretische geval recombinatie optreedt, zal deze recombinant zich niet in het milieu kunnen verspreiden omdat de kippen ten gevolge van de vaccinatie met HVT/ILT-138 immuun zijn voor de ontstane GaHV-2 variant.

Voorts merkt de COGEM op dat vaccins gebaseerd op MeHV-1 al meer dan 30 jaar in de praktijk toegepast worden. Er zijn bij de COGEM geen rapportages bekend over het optreden van recombinatie van dit type vaccins met wildtype virussen. In de literatuur zijn enkele experimentele gegevens bekend over recombinatie van herpesvirussen onderling. De aanvrager geeft aan dat deze experimenten of niet reproduceerbaar waren, of onder niet-natuurlijke condities werden uitgevoerd met vaccinstammen die verschillende deleties bevatten.^{15,16,17,18}

Samengevat concludeert de COGEM dat, als er in het theoretische geval recombinatie van HVT/ILT-138 met wildtype virus optreedt, het risico voor het milieu verwaarloosbaar klein is.

Uitscheiding, overleving en verspreiding in het milieu

Hoewel MeHV-1 veelvuldig gebruikt wordt als kippenvaccin tegen MD en kan repliceren in de kip, verspreidt het virus zich niet onder de kippenpopulatie: uitscheiding van het virus via veerfollikels, verspreiding via huidschilfers en mest, en besmetting via de luchtwegen (de normale besmettingsroute bij de natuurlijke gastheer de kalkoen) vindt niet plaats. De aanvrager bevestigt aan de hand van een studie dat deze bevinding ook geldt voor het op MeHV-1 gebaseerde HVT/ILT-138. Eendagskuikens werden geïnoculeerd met HVT/ILT-138 en vervolgens bij niet-geïnoculeerde kippen geplaatst. Het recombinante virus was in staat in de kuikens te repliceren maar verspreidde zich niet onder de niet-geïnoculeerde kippen. In een andere studie toont de aanvrager aan dat het celgeassocieerde virus buiten een gastheer niet langer dan 48 uur overleeft. De aanvrager concludeert dat als vrije virusdeeltjes door geïnfecteerde kippen uitgescheiden worden, deze niet lang in het milieu zullen overleven. Sinds het gebruik van het op HVT/ILT-138 gebaseerde Innovax-ILT zijn er bij de COGEM geen meldingen bekend over verspreiding van het recombinante virus in het milieu.

Op grond van de gegevens uit de literatuur en de door de aanvrager aangeleverde experimentele studiegegevens acht de COGEM het waarschijnlijk dat de kans dat HVT/ILT-138 zich bij de voorgenomen werkzaamheden in het milieu kan verspreiden verwaarloosbaar klein is.

Conclusie

Gezien het voorafgaande verwacht de COGEM dat de risico's voor mens en milieu bij deze veldstudie met Innovax-ILT onder de voorgenomen werkvoorschriften vermoedelijk verwaarloosbaar klein zijn. Het dossier is echter onvolledig, omdat bepaalde onderbouwende gegevens ontbreken. De COGEM acht aanlevering van deze aanvullende informatie noodzakelijk alvorens tot een eindoordeel te kunnen komen.

Referenties

1. Trapp S & Osterrieder N (2008). Herpesviruses of birds. In: Encyclopedia of Viruses, 405-411. Elsevier Academic Press
2. Osterrieder N *et al.* 2006. Marek's disease virus: from miasma to model. Nature reviews, Microbiology, 4: 283-294
3. King AMQ *et al.* (editors) (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier Academic Press
4. Schat KA & Nair V (2008). Neoplastic diseases: Marek's disease. In: Disease of poultry. 12th ed. Saif, Blackwell publishing, Oxford, UK
5. Hlozaneck I & Sovova V (1974). Lack of pathogenicity of Marek's disease herpesvirus and herpesvirus of Turkeys for mammalian hosts and mammalian cell cultures. Folia Biol. 20: 51-58
6. Sharma JM *et al.* (1972). Lack of pathogenicity of Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys in marmoset monkeys. J Natl Cancer Instit 49:1191-1197
7. Fuchs W *et al.* (2007). Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. Vet res 38: 261-279
8. Zygraich N & Huygelen C (1972). Inoculation of one-day old chicks with different strains of turkey herpesvirus II. Virus replication in tissues of inoculated animals. Avian Dis 16: 793-798
9. Johnson MA & Tyack SG (1995). Molecular evolution of infectious laryngotracheitis virus (ILTV; gallid herpesvirus 1): An ancient example of the Alphaherpesviridae? Vet Mic 46: 221-231
10. Devlin JM *et al.* (2006). A glycoprotein I- and glycoprotein E- deficient mutant of infectious laryngotracheitis virus exhibits impaired cell-to-cell spread in cultured cells. Arch Virol 151:1281-1289
11. IG98-085. Dierspecifieke pox- en herpesvirussen als vectorsysteem voor de ontwikkeling van veterinaire vaccins
12. COGEM (2002). Veldproeven in het kader van een diergeneeskundig onderzoek naar de veiligheid en effectiviteit van een gecombineerd vaccin tegen pseudovogelpest, dat zal worden toegepast op slachtkuikens van kippen. COGEM advies CGM/020318-04
13. COGEM (2003). Reactie op bedenkingen tegen een veldproef met een vaccin tegen pseudovogelpest. COGEM advies CGM/030318-03
14. COGEM (2012). Ingeperkt gebruik van herpesvirusvaccins in lama's. COGEM advies CGM/120207-02
15. Hirai K *et al.* (1990). Replicating Marek's disease virus (MDV) serotype 2 DNA with inserted MDV serotype 1 DNA sequences in Marek's disease lymphoblastoid celline MSB1-41C. Arch Virol 114: 153-165
16. Henderson LM *et al.* (1990). *In vivo* and *in vitro* genetic recombination between conventional and gene-deleted vaccine strains of pseudorabies virus. Am J Res 51: 1656-1662
17. Henderson LM *et al.* (1991). Recombination of pseudorabies virus vaccine strains in swine. Am J Res 52: 820-825
18. Katz JB *et al.* (1990). Recombination *in vivo* of pseudorabies vaccine strains to produce new virus strains. Vaccine 8: 286-288