

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

DATUM 30 augustus 2010
KENMERK CGM/100830-02
ONDERWERP Advies: Inschaling van werkzaamheden met gg-influenza A/Udorn/307/72

Geachte mevrouw Huizinga,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijzigingsverzoek van vergunning IG 05-097/05 met de titel 'Identificatie en karakterisering van bacteriële componenten' van de Stichting Katholieke Universiteit, UMC St. Radboud, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) influenza A virussen die gebaseerd zijn op de influenza A/Udorn/307/72 en A/Puerto Rico/8/34 virussen. De aanvrager wil met deze gg-influenza A virussen het effect bestuderen van verschillende virale eiwitten op de gevoeligheid van door virus geïnficeerde cellen voor bacteriën. De aanvrager wil de laboratoriumwerkzaamheden uitvoeren op ML-II inperkingsniveau.

De COGEM is van mening dat werkzaamheden met gg-influenza A virussen op ML-II niveau ingeschaald kunnen worden als het virus waarop deze ggo's gebaseerd zijn, kan worden geclassificeerd als een sterk geattenuerd virus. Zoals al eerder aangegeven, beschouwt de COGEM het influenza A/Puerto Rico/8/34 virus als een laagpathogeen virus. Voor de voorgenomen werkzaamheden met de gg-influenza A/Puerto Rico/8/34 virussen kan de COGEM derhalve instemmen met een inschaling op ML-II inperkingsniveau. Daarbij adviseert zij de aanvullende voorschriften te hanteren, die zij in haar generieke advies geformuleerd heeft voor dit type werkzaamheden.

Op basis van de aangeleverde gegevens en de wetenschappelijke literatuur is de COGEM van mening dat de attenuatie van de influenza A/Udorn/307/72 onvoldoende bewezen is, om een classificatie als laagpathogeen virus te rechtvaardigen. Derhalve kan de COGEM op dit moment niet instemmen met een inschaling van de voorgenomen werkzaamheden met gg- influenza A/Udorn/307/72 op ML-II inperkingsniveau. Conform de reguliere classificatie van influenza A virussen in pathogeniteitsklasse 3, adviseert de COGEM de werkzaamheden met de gg-influenza A/Udorn/307/72 derhalve in te schalen op inperkingsniveau ML-III. Om eventuele risico's verder te beperken adviseert de COGEM daarbij enkele aanvullende voorschriften te hanteren.

Op bovengenoemde inperkingsniveau's en onder navolging van gestelde voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu die verbonden zijn aan de werkzaamheden met deze gg-influenza A virussen 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 loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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 genetisch gemodificeerde influenza A/Udorn/307/72

COGEM advies CGM/100830-02

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-)influenza A virussen die gebaseerd zijn op de backbone van influenza A/Udorn/307/72 en influenza A/Puerto Rico/8/34. De aanvrager, het UMC st Radboud, verzoekt de gg-influenza A virussen aan haar vergunning IG 05-097/05 met de titel “Identificatie en karakterisering van bacteriële componenten” toe te voegen. Met behulp van de gg-influenza virussen wil de aanvrager het effect bestuderen van verschillende virale genproducten op de gevoeligheid van virusgeïnfecteerde cellen voor bacteriële infecties. Voor dit doel worden animale cellen geïnfecteerd met gg-influenza A virussen gevolgd door een infectie met bacteriële micro-organismen. Vervolgens wordt het effect van deze infectie op de cellen en de adhesie en invasie van de micro-organismen bepaald. De aanvrager beschouwt beide influenza A stammen als geattenuerde virussen en heeft verzocht de genoemde werkzaamheden met de gg-influenza A virussen op ML-II inperkingsniveau uit te mogen voeren.

Influenza A virussen

Het influenzavirus, in de volksmond beter bekend als het griepvirus, wordt van persoon tot persoon overgedragen door hoesten of niezen. Het is een RNA virus dat behoort tot de familie *Orthomyxoviridae*. Het virus is onderverdeeld in drie typen, influenza A, B en C.^{1,2} Alleen het *Influenza A virus* kan zowel mensen, vogels als zoogdieren infecteren. Het genoom van het *Influenza A virus* bestaat uit acht unieke genoomsegmenten die coderen voor tien eiwitten, waaronder hemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA). De HA en NA eiwitten spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen het virus.³

Classificatie van influenzavirussen vindt plaats op basis van de aanwezige HA en NA subtypen. In totaal zijn er voor het *Influenza A virus* 16 verschillende haemagglutinine subtypen (H1 t/m H16) en 9 verschillende neuraminidase subtypen (N1 t/m N9) bekend. Bij vogels komen alle subtypen voor. Bij de mens komen voor zover bekend alleen de H1, H2, H3, H5, H7, H9, N1 en N2 subtypen voor.^{4,5}

Pathogeniteit van influenza A virussen

De pathogeniteit van influenza A virussen wordt door een aantal factoren bepaald. De eiwitten die bijdragen aan de virulentie zijn het niet-structurele eiwit NS1, de polymerase eiwitten PA, PB1 en PB2 en de HA en NA eiwitten.^{1,6-11} Uit onderzoek is gebleken dat één aminozuurverandering in het PB2 eiwit voldoende is om een van oorsprong laag virulente virusstam virulent te maken.^{3,4,7,12} Het HA eiwit heeft een specifieke klievingplaats voor een cellulair protease. Voor de infectiviteit van het virus is het splitsen van het HA eiwit in HA1 en HA2 een belangrijke stap. Het

betreffende protease is voornamelijk actief in epitheelcellen van de luchtwegen, waardoor deze cellen vatbaar zijn voor het virus. Een verandering van enkele aminozuren in een serie basische aminozuren in deze klievingplaats zorgt ervoor dat ook andere proteasen (PC1 en furine), die actief zijn in andere cellen, het HA eiwit kunnen klieven.^{4,7,12} Hierdoor verandert de specificiteit en gastheer-bereik van het virus, maar ook de pathogeniteit.^{3,4,13} Uit de influenzavirus-uitbraken in het verleden blijkt dat de aanwezigheid van een polybasische klievingsplaats in het HA eiwit een belangrijke aanwijzing is voor de pathogeniteit van het virus. Dit kenmerk is echter niet aanwezig in de hoogpathogene influenzastam uit 1918, die verantwoordelijk is voor de Spaanse griep.¹⁴⁻¹⁷

De gastheerspecificiteit van het influenzavirus wordt onder meer bepaald door het HA eiwit. De aviaire influenza A virussen binden via het HA eiwit voornamelijk aan het sialzuur α 2,3-galactose. De humane influenza A virussen binden met name aan het sialzuur α 2,6-galactose dat onder andere op de epitheelcellen aanwezig is van de neus, de keel en de hogere luchtwegen.^{12,18,20} Het verschil in herkenning van het HA eiwit voor de receptor is gelegen in slechts twee aminozuren van het HA eiwit. Een mutatie hierin kan ervoor zorgen dat een influenzavirus dat alleen vogels als gastheer heeft, ook in staat is om humane cellen te infecteren en vice versa.⁴ In varkens worden beide typen receptoren veelvuldig aangetroffen, waardoor zij gevoelig zijn voor infectie met influenza virussen van verschillende gastheren. Deze dieren worden daarom als mengvat gezien voor het ontstaan van potentiële pathogene influenzavirussen. Hierbij dient te worden opgemerkt dat onlangs duidelijk is geworden dat de mens en het varken voor beide receptoren een vergelijkbaar expressiepatroon hebben.^{19,20}

De gg-influenza A virussen

Voor de bestudering van het effect van verschillende virale genproducten op de gevoeligheid van virusgeïnfecteerde cellen voor bacteriële infecties wil de aanvrager gebruik maken van de influenza A/Puerto Rico/8/34 en influenza A/Udorn/307/72 stammen en afgeleiden daarvan.

Influenza A/Puerto Rico/8/34 is een H1N1 influenza virus waarvan uit de wetenschappelijke literatuur blijkt dat het niet virulent is voor mensen.²¹⁻²⁴ De aanvrager merkt op dat het HA eiwit van dit type *Influenza A virus* voornamelijk bindt aan het sialzuur α 2,3-galactose, waardoor influenza A/Puerto Rico/8/34 voor een humane infectie aangewezen is op de lagere luchtwegen.

A/Udorn/307/72 is een humaan H3N2 influenza virus dat in 1972 geïsoleerd is tijdens een seizoensgebonden griepuitbraak in Rusland. Het wildtype influenza A/Udorn/307/72 bindt via het HA eiwit zowel het sialzuur α 2,3-galactose als het sialzuur α 2,6-galactose. Hierdoor infecteert het niet alleen de lagere luchtwegen, maar ook de neus, keel en bovenste luchtwegen.²⁵ De H3N2 en H1N1 virussen behoren tot de influenzavirussen die jaarlijks epidemieën veroorzaken in de bevolking.

De aanvrager wil gaan werken met vier recombinante virussen die op de influenza A/Puerto Rico/8/34 stam gebaseerd zijn. Twee van deze recombinante virussen bevatten zeven gensegmenten, die afkomstig zijn van influenza A/Puerto Rico/8/34 en één gensegment, hetzij N2 hetzij H3, van influenza A/Udorn /307/72. De andere twee recombinanten bevatten alle gensegmenten van A/Puerto Rico/8/34 waarbij het niet-structurele eiwit 1 (NS1) gefuseerd is met het zogenaamde 'Green fluorescent protein' of het zogenaamde 'mCherry fluorescent protein'.

Door de introductie van het HA-coderende gensegment van influenza A/Udorn /307/72 in influenza A/Puerto Rico/8/34 zal een uitbreiding van het tropisme optreden.

De aanvrager wil tevens gebruik maken van vier vergelijkbare recombinante virussen die gebaseerd zijn op influenza A/Udorn/307/72. Twee recombinanten bevatten zeven gensegmenten afkomstig van influenza A/Udorn/307/72 en één gensegment (N1 of H1) van influenza A/Puerto Rico/8/34 en twee recombinanten bevatten alle acht gensegmenten van influenza A/Udorn/307/72, waarin het niet-structurele eiwit 1 (NS1) gefuseerd is met het zogenaamde 'Green fluorescent protein' of het 'mCherry fluorescent protein'. De aanvrager stelt dat het tropisme van de A/Udorn/307/72 reassortant met het HA-coderende gensegment van A/Puerto Rico/8/34 beperkt zal zijn tot de cellen in de lagere luchtwegen.

Eerder COGEM advies

In 2004 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van influenza A virussen.²⁶ De COGEM heeft destijds geadviseerd om de ggo activiteiten met influenza A virussen in te delen in pathogeniteitsklasse 3, aangezien influenza A virussen in staat zijn om zich op een relatief eenvoudige manier aan te passen tot hoogpathogene stammen én omdat deze virussen een potentieel gezondheidsrisico voor mens en dier vormen. Deze indeling houdt onder andere in dat de ggo activiteiten minimaal uitgevoerd dienen te worden op ML-III of DM-III niveau, waarbij afhankelijk van het type werkzaamheden aanvullende eisen gesteld kunnen worden, zoals adembescherming, vaccinatie en toepassing van antivirale middelen.

Tot op heden is de COGEM in haar adviezen over werkzaamheden met gg-influenza A virussen drie maal van bovengenoemde inschaling afgeweken. Het betrof werkzaamheden met recombinanten die gebaseerd waren op influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), influenza A/WSN/33 (H1N1) influenza A/Port Chalmers/1/73 (H3N2) en influenza A/Leningrad/134/17/57 (H2N2).^{27,28,30,31} Aangezien bovengenoemde virussen sterk verzwakt zijn, was de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein waren, indien de voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden onder enkele aanvullende voorschriften op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd zouden worden. In 2006 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over onder meer de te hanteren aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met verzwakte genetisch gemodificeerde influenza A virussen op ML-II niveau.²⁹

Samengevat, moet er aan drie voorwaarden worden voldaan voordat de COGEM laboratoriumwerkzaamheden met recombinante influenza A virussen inschaalt op ML-II inperkings niveau. De voorwaarden zijn:

- de genetisch gemodificeerde influenza A virussen bestaan uit minimaal zes genoomsegmenten afkomstig van een niet-virulente verzwakte laboratoriumstam in combinatie met één of twee genoomsegmenten van andere influenzavirussen,
- de heterologe gensegmenten zijn volledig gekarakteriseerd,
- voor heterologe HA-coderende gensegmenten geldt dat de aanwezigheid van een polybasische klievingsplaats is uitgesloten.

Daarbij heeft de COGEM geadviseerd bij werkzaamheden onder ML-II niveau de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse-II,
- medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden,
- het dragen van handschoenen is verplicht,
- medewerkers dienen een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) te dragen óf gevaccineerd te zijn.

Specifiek voor werkzaamheden met kippeneieren heeft de COGEM daar nog de volgende voorschriften aan toegevoegd:

- geïnfecteerde eieren worden in een gesloten vloeistofdichte doos in een stoof bebroed,
- de dozen worden uitsluitend geopend in een veiligheidskabinet klasse-II. Bij eventuele breuk van een ei wordt de gesloten doos in zijn geheel geautoclaveerd.

Overweging en advies

De gg-influenza A/Puerto Rico/8/34 virussen

Zoals hierboven beschreven, is de COGEM van mening dat handelingen met genetisch gemodificeerde influenza A virussen onder inperkingsniveau ML-II plaats kunnen vinden als de virussen laagpathogeen zijn. De COGEM heeft het influenza A/Puerto Rico/8/34 reeds in 2005 geclassificeerd als een sterk geattenuerd influenza A virus.²⁷ De aanvrager wil onder andere gaan werken met gg-influenza A virussen die minimaal zeven gensegmenten van influenza A/Puerto Rico/8/34 bevatten. Daarbij is het heterologe HA-coderende gensegment dat een van de reassortanten bevat afkomstig van influenza A/Udorn/307/72. Dit HA eiwit bevat geen polybasische klievingsplaats.³² Bovendien is de aanvrager niet van plan gensegmenten te gebruiken die niet volledig gekarakteriseerd zijn. Op basis van deze gegevens adviseert de COGEM de werkzaamheden met de ggo's die op het influenza A/Puerto Rico/8/34 virus gebaseerd zijn, in te schalen op ML-II inperkings niveau en daarbij de bovengenoemde aanvullende voorschriften te hanteren.

De gg-influenza A/Udorn/307/72 virussen

Influenza A/Udorn/307/72 is net als influenza A/Puerto Rico/8/34 een relatief oud seizoensgebonden virus, dat al decennia lang in de humane populatie circuleert. De aanvrager leidt daaruit af dat de humane populatie een zogenaamde kudde-immuniteit heeft opgebouwd tegen dit virus. De COGEM merkt op dat er geen gegevens overlegd worden in welke mate deze immuniteit in de populatie aanwezig is. Bovendien is de COGEM van mening dat de aanwezigheid van kudde-immuniteit geen directe informatie levert over de mogelijke pathogene eigenschappen van de influenza A/Udorn 307/72 stam.

De aanvrager meldt dat het influenza A/Udorn/307/72 virus meer dan 50 maal gepasseerd is in muizen en kippenieren. Hij vermoedt dat de stam hierdoor net als influenza A/Puerto Rico/8/34 significant geattenuëerd is voor replicatie in mensen en er geen transmissie tussen mensen op kan treden. De aanvrager overlegt data over de replicatie van beide stammen na intranasale inoculatie van muizen. Hieruit blijkt dat de replicatie van influenza A/Udorn/307/72 in de neus en longen van het geteste muismodel niet hoger is dan de replicatie van de sterk geattenuëerde influenza A/Puerto Rico/8/34 stam. Ook de geteste reassortante influenzavirussen van beide stammen laten geen hogere replicatie zien dan de *wildtype* ouderstammen.

De COGEM merkt op dat de mogelijke attenuatie van het influenza A/Udorn/307/72 virus niet is onderzocht in bijvoorbeeld fretten. Deze dieren worden algemeen beschouwd als een adequaat proefdiermodel om de mogelijke attenuatie van influenzavirussen te bestuderen. Hoewel de COGEM niet bekend is met studies waarin de virulentie van influenza A/Udorn/307/72 uitvoerig is onderzocht, wordt een infectie van influenza A/Udorn/307/72 in hamsters, doodskopaapjes en fretten wel geassocieerd met ziekteverschijnselen zoals koorts.³³ In het verleden zijn de mogelijkheden van de influenza A/Udorn/307/72 stam als kandidaat vaccin enkele malen onderzocht. In de wetenschappelijke literatuur wordt hierover opgemerkt dat zelfs een enkelvoudige temperatuurgevoelige mutant van influenza A/Udorn/307/72 onvoldoende geattenuëerd is om als vaccin te kunnen dienen.^{34,35}

Gezien bovenstaande overwegingen, is de COGEM van mening dat er op dit moment geen overtuigend bewijs is waarmee een classificatie van de influenza A/Udorn/307/72 stam als laagpathogeen influenza A virus voldoende onderbouwd wordt. De COGEM adviseert daarom dat laboratoriumactiviteiten met recombinante influenza A virussen gebaseerd op influenza A/Udorn/307/72 op ML-III inperkingsniveau in te schalen. Om eventuele risico's verder te beperken, adviseert de COGEM daarbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- open handelingen vinden plaats in een veiligheidskabinet klasse-II,
- medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen humaan *Influenza A virus*,
- medewerkers met griepsymptomen dienen te worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden,
- het dragen van handschoenen is verplicht,
- medewerkers dienen een mond- en neuskapje (Europees CE gecertificeerd EN143 P2 of EN149 FFP2) te dragen.

Conclusie

In het geval van de gg-influenza A/Puerto Rico/8/34 virussen adviseert de COGEM de voorgenomen werkzaamheden in te schalen op ML-II inperkingsniveau. Indien de werkzaamheden op dit inperkingsniveau worden uitgevoerd en de daarbij voorgeschreven aanvullende voorschriften worden gehanteerd, acht de COGEM de veiligheid voor mens en milieu afdoende gewaarborgd.

Wat betreft de gg-influenza A/Udorn/307/72 virussen acht de COGEM het noodzakelijk dat de werkzaamheden uitgevoerd worden op ML-III niveau. Op dit inperkingsniveau en onder

navolging van de genoemde aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu die verbonden zijn aan de werkzaamheden met deze virussen verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Knipe, MD en Howley, PM (2001). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
2. Van Regenmortel, MHV (2000). *Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses*. Academic Press, San Diego
3. Brown, EG (2000). Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* 54: 196-209
4. Flint, SJ *et al.* (2004). *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control*. ASM Press, Washington, D.C.
5. Lewis, DB (2006). Avian flu to human influenza. *Annu Rev Med* 57: 139-154
6. Zambon, MC (2001). The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol* 11: 227-41
7. Hatta, M *et al.* (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293: 1840-1842
8. Webster, RG *et al.* (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56: 152-179
9. Matrosovich, M *et al.* (2000). Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol* 74: 8502-8512
10. Kobasa, D *et al.* (1999). Amino acid residues contributing to the substrate specificity of the influenza A virus neuraminidase. *J Virol* 73: 6743-6751
11. Seo, SH *et al.* (2002). Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med* 8: 950-954
12. Horimoto, T en Kawaoka, Y (2001). Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev* 14: 129-149
13. Ito, T *et al.* (2001). Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *J Virol* 75, blz. 4439-43
14. Stevens, J *et al.* (2004). Structure of the uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science* 303: 1866-1870
15. Reid, AH *et al.* (1999). Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1651-1656
16. Goto, H en Kawaoka, Y (1998). A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10224-10228
17. Kobasa, D *et al.* (2004). Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature* 431: 703-707
18. Rogers, GN en D'Souza, BL (1989). Receptor binding properties of human and animal H1

- influenza virus isolates. *Virology* 173: 317-322
19. Nelli, RK *et al.* (2010) Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet Res* 6: 4
 20. Shinya, K *et al.* (2006). Influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440: 435-436
 21. World Health Organization (WHO), Production of pilot lots of inactivated influenza vaccines from reassortants derived from avian influenza viruses. Interim biosafety risk assessment. (2003), no. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.5
 22. Subbarao, K *et al.* (2003). Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology* 305: 192-200
 23. Taubenberger, JK (1998). Influenza virus hemagglutinin cleavage into HA1, HA2: no laughing matter. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9713-9715
 24. Wood, JM en Robertson, JS (2004). From lethal virus to life-saving vaccine: developing inactivated vaccines for pandemic influenza. *Nat Rev Microbiol* 2: 842-847
 25. Meng, B *et al.* (2010). The receptor preference of influenza viruses. *Influenza Other Respi Viruses* 4: 147-153
 26. COGEM (2004). Inschaling van Influenza A virusstammen. COGEM advies CGM/040326-03
 27. COGEM (2005). Pathogeniteitstudies met recombinant Influenza A virussen. COGEM advies CGM/050201-01
 28. COGEM (2006). Advies ontwikkeling van influenza virus m.b.v. een reverse genetics systeem. COGEM advies CGM/060724-03
 29. COGEM (2006). Advies aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met gg-influenzavirussen. COGEM advies CGM/061214-01.
 30. COGEM (2007). Advies aanvullende voorschriften bij werkzaamheden met gg-influenza A virussen. COGEM advies CGM/070328-01
 31. COGEM (2007). Advies inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd influenzavirus. COGEM advies CGM/070510-02
 32. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M54895.1> (25 augustus 2010)
 33. Murphy, BR *et al.* (1982). Virulence of avian influenza A viruses for squirrel monkeys. *Infect Immun* 37: 1119-1126
 34. Kim HW *et al.* (1976) Temperature-sensitive mutants of influenza A virus: response of children to the influenza A/Hong Kong/68-ts-1(E) (H3N2) and influenza A/Udorn/72-ts-1(E) (H3N2) candidate vaccine viruses and significance of immunity to neuraminidase antigen. *Pediatr Res* 10: 239-242
 35. Richman, DD *et al.* (1976). Temperature-sensitive mutants of influenza A virus. XII. Safety, antigenicity, transmissibility, and efficacy of influenza A/Udorn/72-ts-1[E] recombinant viruses in human adults. *J Infect Dis* 134: 585-594