

在2007年药物重新分类、2008年耐药株输入以及2009年流感大流行情况下追踪新西兰流感病毒对奥司他韦耐药情况

Richard Hall^a, Matthew Peacey^a, Jacqui Ralston^a, Danielle de Joux^a, Judy Bocacao^a, Mackenzie Nicol^a, Molly Ziki^a, Wendy Gunn^a, Jing Wanga和Q Sue Huang^a

通讯作者: Richard J Hall (e-mail: richard.hall@esr.cri.nz)。

引言: 奥司他韦(商品名达菲)是抗击流感病毒的一种重要药物。已经发生的两起全球性事件突显了开展流感病毒奥司他韦耐药性监测的重要性: 2008年出现耐奥司他韦的季节性流感病毒A(H1N1), 及2009年出现A(H1N1)大流行流感[A(H1N1)pdm09]病毒。奥司他韦在新西兰属处方药, 但为了提高获得药物的及时性, 自2007年起新西兰允许药店直接将奥司他韦销售给具有流感样症状的患者。

目的: 确定在2007年药物重新分类、2008年耐奥司他韦季节性流感病毒输入以及2009年出现流感大流行三个不同时期奥司他韦耐药发生情况。

方法: 使用神经氨酸酶抑制试验荧光测定法对1795株流感病毒进行奥司他韦耐药性检测, 病毒株收集自2006–2010年间流感哨点监测项目。

结果: 2006–2010年的所有B型流感病毒、A(H3N2)型流感病毒以及A(H1N1)pdm09流感病毒均对奥司他韦敏感。2008年和2009年的季节性流感病毒A(H1N1)对奥司他韦耐药。神经氨酸酶基因序列测定结果显示, 耐药病毒株发生了H275Y突变, 且在一株具有极高耐药性的季节性流感病毒A(H1N1)神经氨酸酶基因序列中发现了S247N。

讨论: 没有证据表明提高奥司他韦药物可及性会促进奥司他韦耐药性的产生。在2008年1月欧洲首次报告奥司他韦耐药株并成为2008全球耐药株9个月后, 新西兰也发生了该耐药株的输入。

在 过去十年间, 全球对人类流感病毒抗病毒药物耐药性的发生、发展进行了大量研究^[1]。人们开发出一类十分有效的抗流感病毒药物, 即神经氨酸酶抑制剂, 其中就包括磷酸奥司他韦(商品名达菲)。神经氨酸酶抑制剂通过选择性地结合神经氨酸酶的活性位点, 阻止结合在宿主细胞上的唾液酸的裂解, 阻抑病毒粒子从宿主细胞中释放, 这样病毒就不能从受感染宿主细胞中释放出来, 也就不能继续感染新的细胞^[2]。临床试验表明, 使用奥司他韦可以减轻病例的严重程度, 并可以使病程缩短^[3–5]。据报道, 奥司他韦使用十分广泛, 全球使用量达6500万剂次^[6]。因此, 需密切监视奥司他韦对流感病毒的耐药性, 以确定该药是否对治疗流感继续有效^[7]。这项工作不仅可以决定奥司他韦的现行疗效, 也可以揭示抗流感病毒药物的耐药性发生情况。

在新西兰, 奥司他韦是一种处方药, 如果在感染后48小时内使用, 对治疗流感最为有效。为提高获取奥司他韦的可及性, 减少因必须医生提供处方而造成的延迟, 2007年新西兰允许药房在冬季流感流行季节(4–11月)直接给患者提供该药。药剂师为患者直接提供奥司他韦的前提是: 确保患者是新西兰居民、

年龄在12岁及以上、具有流感症状^[8]。出台该项许可措施的同时, 也期待对社区流感病毒产生奥司他韦耐药性的潜在风险进行监控^[9]。

在2007/2008年北半球流感流行季节前, 人类季节性流感病毒对奥司他韦耐药处于非常低的水平^[10]。英国在社区样本中检测到A(H1N1)pdm09流感病毒耐药发生率增高^[11], 澳大利亚还报告该毒株引起了社区持续传播^[12]。检测显示耐药是由一系列突变引起的, 特别是A(H1N1)流感病毒神经氨酸酶(NA)基因在275位的组氨酸(His)突变为酪氨酸(Tyr)(N1记位, 以下称H275Y)^[13]。在2007/2008年流行期的冬季, 欧洲季节性流感病毒A(H1N1)耐药株发生率相对较高(平均~20%)^[14,15], 这些耐药株都具有H275Y突变, 其后在世界许多其它地区也有报道^[16–18]。

本研究对2006–2010年新西兰流感病毒奥司他韦耐药情况进行了监测。监测期间发生了一系列对流感病毒耐药特征可能存在潜在影响的事件, 包括2007年奥司他韦可以在药房直接销售、2008年耐药性季节性流感病毒的输入以及出现A(H1N1)pdm09大流行流感。我们就监测结果与新西兰抗病毒药物耐药

^a 新西兰国家生物安全及传染病中心环境科学研究所世界卫生组织国家流感中心。

投稿日期: 2012年8月9日; 刊发日期: 2012年12月10日

doi: 10.5365/wpsar.2012.3.3.002

性产生情况、监测的重要性以及与国外耐药情况的关系进行了讨论。

方法

临床资料

临床标本采集作为新西兰国家流感哨点监测项目的一部分，具体方法以前已经报道过^[19,20]。简单说，就是每周从全科医生那里收集流感样病例的标本，流感样病例的定义是突然发病且至少具有以下临床表现之两项的急性呼吸道感染者：发热、畏寒、头痛和肌痛。标本为病人的鼻咽拭子或咽拭子，放入病毒运送培养基转运到实验室。2006–2008年的标本采集于5–9月的冬季流感流行季节。2009年和2010年，因为流感大流行的原故流感监测时间延长，标本采集时间为全年^[21]。另外，作为参比检测服务的一部分，新西兰每年监测期间还会从医院临床诊断实验室收集部分标本。这些医院位于奥克兰 (Auckland)、怀卡托 (Waikato)、基督城 (Christchurch) 和但尼丁 (Dunedin)。

流感病毒的诊断依据实时逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR, 美国CDC建立的方法, 由WHO推荐) 或病毒培养, 培养出的病毒使用WHO参考抗血清用血凝/血凝抑制试验进行鉴定。

病毒培养

2006–2008年的流感病毒用犬肾细胞 (MDCK) 培养, 细胞培养液为含TPCK-胰蛋白酶的无血清M199。自2009年起, 通过MDCK-SIAT1细胞系来培养病毒, 培养液为含有TPCK-胰蛋白酶的DMEM:F12^[22]。

神经氨酸酶抑制试验荧光测定法

如文献报道^[23,24], 本文使用神经氨酸酶抑制试验荧光测定法检测流感病毒对奥司他韦的敏感性。简单地说, 首先用含1% NP-40的缓冲液稀释流感病毒培养物中的神经氨酸酶, 季节性流感病毒稀释率为1:10, A(H1N1)pdm09流感病毒稀释率为1:20。使用系列稀释的奥司他韦羧酸盐 (来自瑞士罗氏公司) 与荧光底物MUNANA在30°C条件下作用1小时, 然后测定荧光值 (释放波长为360nm, 激发波长为448nm)。用GraphPad PRISM (5.04版) 绘制对数“剂量-反应”曲线来计算50%抑制浓度 (IC₅₀)。IC₅₀代表在此浓度下, 奥司他韦对神经氨酸酶活性抑制率为50%。大于IC₅₀均值2个标准差的初始测量值为离群值, 应对病毒进行滴定检测, 以确保病毒稀释液在神经氨酸酶活性线性范围的中点。根据需要对初始测量值重新计算,

得出调整的IC₅₀, 并纳入最后的分析。某种流感病毒亚型的IC₅₀均值有10倍以上增高, 作为流感病毒对奥司他韦耐药的指标^[25]。

神经氨酸酶基因的序列测定

使用Zymo病毒RNA提取试剂盒 (美国加州欧文市Zymo研究公司, 产品号R1034) 从临床标本中直接提取病毒RNA。使用流感病毒NA基因的通用引物^[26]扩增NA全基因, 同样的引物被用来进行Sanger法直接测序 (荷兰尼沃凯尔克市应用生物系统公司的Big Dye Terminator V.3.1循环测序试剂盒), 测序仪为毛细管测序仪 (美国加州福斯特市应用生物系统公司的3100 Avant型)。

奥司他韦销售数据

2004年和2007年奥司他韦销售数据由罗氏制药公司友情提供, 包括处方销售和药房直接销售数据。

伦理学声明

样本采集作为公共卫生监测的一部分。临床研究符合新西兰卫生法及残疾服务消费者权益法。

结果

使用神经氨酸酶抑制试验荧光测定法, 对2006–2010年收集的1795株流感病毒开展了奥司他韦敏感性检测 (见图1、表1)。

检测结果显示, 2006–2007年间的所有521株A型流感病毒及所有133株B型流感病毒均对奥司他韦敏感。2008年的306株B型流感病毒和120株A(H3N2)流感病毒也对奥司他韦敏感, 但是, 同年分离出的全部4株季节性流感病毒A(H1N1)均对奥司他韦耐药, IC₅₀在573nM–1184nM之间 (见图1、表1)。

对这些病毒株中的2株病毒开展NA全基因测序 (序列覆盖范围为21–1413和22–940位的核苷酸), 均提示存在H275Y突变, 测序区域和同年早些时候欧洲报告的2008耐药型病毒几乎完全相同 (分别为99%和100%) [GenBank登记号: EU566977; A/Pennsylvania/02/2008(H1N1)]。只观察到一个核苷酸的差异 (E268D替代; 804位G/T核苷酸; N1亚型位)。

正如我们此前曾报道的^[27], 所有开展奥司他韦敏感性检测的2009年季节性流感病毒A(H1N1)都对奥司他韦耐药 ($n=25$ 株; 见图1、表1), IC₅₀

表1. 2006–2010年间新西兰流感病毒分离株IC₅₀的比较

流感病毒型/亚型		年份				
		2006	2007	2008	2009	2010
B型	检测病毒株数	1	132	306	-	1
	平均IC ₅₀ (nM)	-	37.5	26.5	-	-
	标准差(nM)	-	22.5	16.9	-	-
	最小IC ₅₀ (nM)	-	0.9	0.2	-	-
	最大IC ₅₀ (nM)	-	97.4	87.8	-	-
	奥司他韦耐药株	-	无	无	-	无
A(H3N2)	检测病毒株数	189	45	120	-	1
	平均IC ₅₀ (nM)	0.7	0.4	0.3	-	-
	标准差(nM)	0.3	0.3	0.2	-	-
	最小IC ₅₀ (nM)	0.1	0.1	0.1	-	-
	最大IC ₅₀ (nM)	1.4	1.1	1.1	-	-
	奥司他韦耐药株	无	无	无	-	无
A(H1N1)	检测病毒株数	18	136	4	25	-
	平均IC ₅₀ (nM)	1.3	0.8	768	1385	-
	标准差(nM)	0.9	0.6	287	1996	-
	最小IC ₅₀ (nM)	0.2	0.1	573	305	-
	最大IC ₅₀ (nM)	3.0	2.7	1184	7912	-
	奥司他韦耐药株	无	无	有	有	-
A(H1N1)pdm09	检测病毒株数	-	-	-	483	334
	平均IC ₅₀ (nM)	-	-	-	0.4	0.7
	标准差(nM)	-	-	-	0.2	0.4
	最小IC ₅₀ (nM)	-	-	-	0.1	0.1
	最大IC ₅₀ (nM)	-	-	-	1.4	2.1
	奥司他韦耐药株	-	-	-	无	无

* IC₅₀ – 使酶活性降低50%时药物的抑制浓度。

在305nM–7912nM之间^[27]。RFLP及测序显示，所有这些病毒都包含H275Y突变。本研究发现3株季节性流感病毒A(H1N1)有极高的IC₅₀值，分别为5334nM、6370nM和7912nM(见图1)，对其中的7912nM病毒(A/Wellington/31/2009)的NA基因进行进一步测序，发现除了存在H275Y突变(GenBank登记号为KC117387)，还存在另一重要的S247N突变(N1计位)。

本研究检测的2009–2010年的所有A(H1N1)pdm09流感病毒均对奥司他韦敏感(见图1、表1)，对其中11株病毒的NA基因进行测序，发现均未发生H275Y突变。

2004年和2007年新西兰奥司他韦销售数据显示，其使用量增加了4.5倍，从2004年销售373剂上升至2007年销售1678剂(图2)。2004年和2007年的最大差异出现在第34周，在这一周2007年销售的奥司他韦比2004年同期多出161剂。由于新西兰拥有450万人口，奥司他韦使用量的增加与总人口相比极其微小。

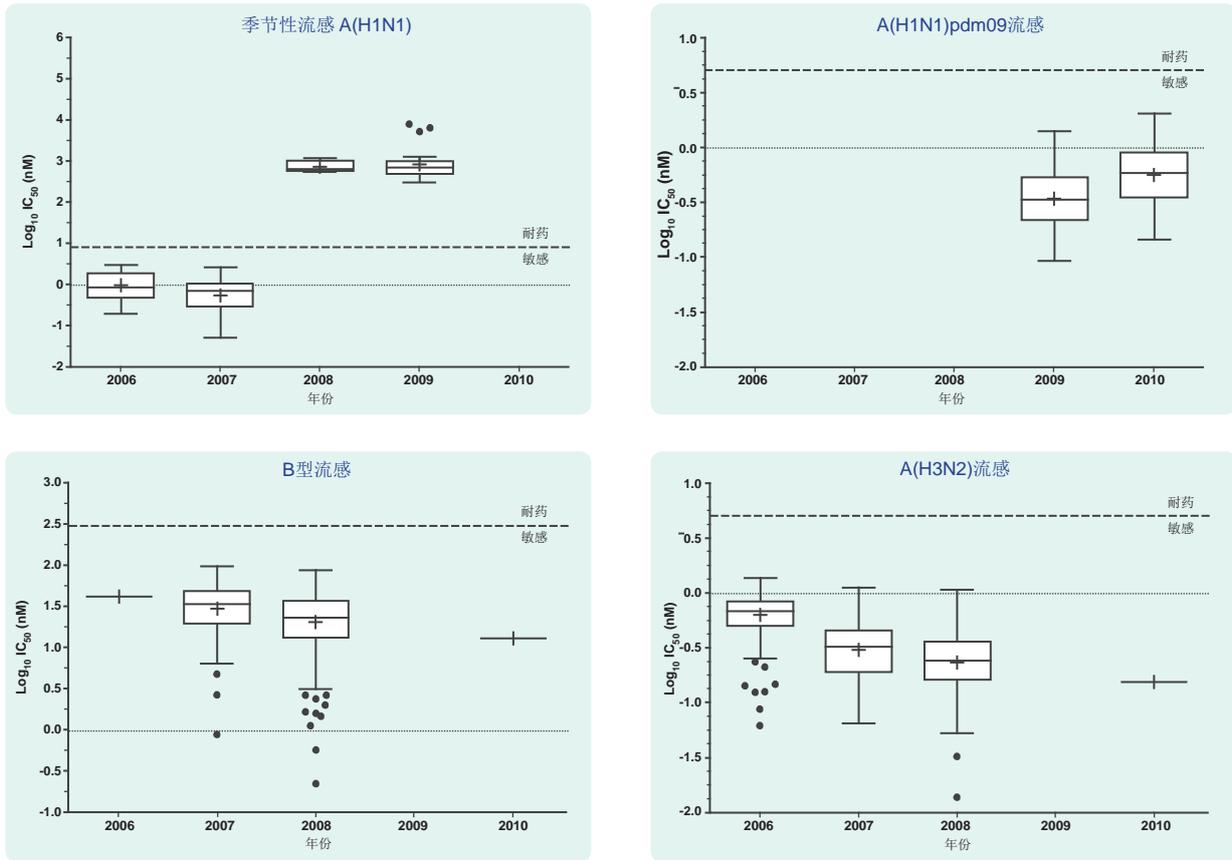
讨论

研究显示，2006–2010年新西兰大多数人类流感病毒对抗病毒药物奥司他韦的耐药处于非常低的水平。

但是，自2008年1月以后，季节性流感病毒A(H1N1)显示出较高的耐药水平。该病毒似乎是在冬季流感季节时已经到达新西兰(一个南半球国家)，即在欧洲首次报道出现该病毒的9个月^[14,15]。其他南半球国家如澳大利亚、南非及南美洲国家也在2008年底报道出现奥司他韦耐药性季节性流感病毒^[17,28]。耐药性季节性流感病毒A(H1N1)成为新西兰2009年流感流行季节前半段的优势毒株，显示该病毒既可在人群中持续传播，同时还能保持对奥司他韦的耐药性^[29]。有趣的是，我们也注意到3株出现S247N和H275Y双重突变的季节性流感病毒A(H1N1)，对奥司他韦表现出极高的耐药性。据报道，S247N突变降低了季节性流感病毒A(H1N1)^[30]和流感病毒A(H5N1)^[31]对奥司他韦的敏感性，而且知道它和H275Y联合突变会导致A(H1N1)pdm09流感病毒对奥司他韦产生极高的耐药性^[32]。我们的研究结果提示，S247N和H275Y双重突变的存在对季节性流感病毒A(H1N1)也可能产生类似的影响。

2008年之前，我们在新西兰没有观察到任何类型或亚型的季节性流感病毒对奥司他韦耐药，包括在2007年新西兰奥司他韦监管发生变化的情况下，即在冬季流感流行季节，允许药剂师给具有流感样症状的病人提供奥司他韦药物^[8]。英国也设立了类似制度，在流感暴发时，有资质的药剂师可以向高危人群提供奥司他韦^[33]。提高公众药物可及性，由于接受治疗个

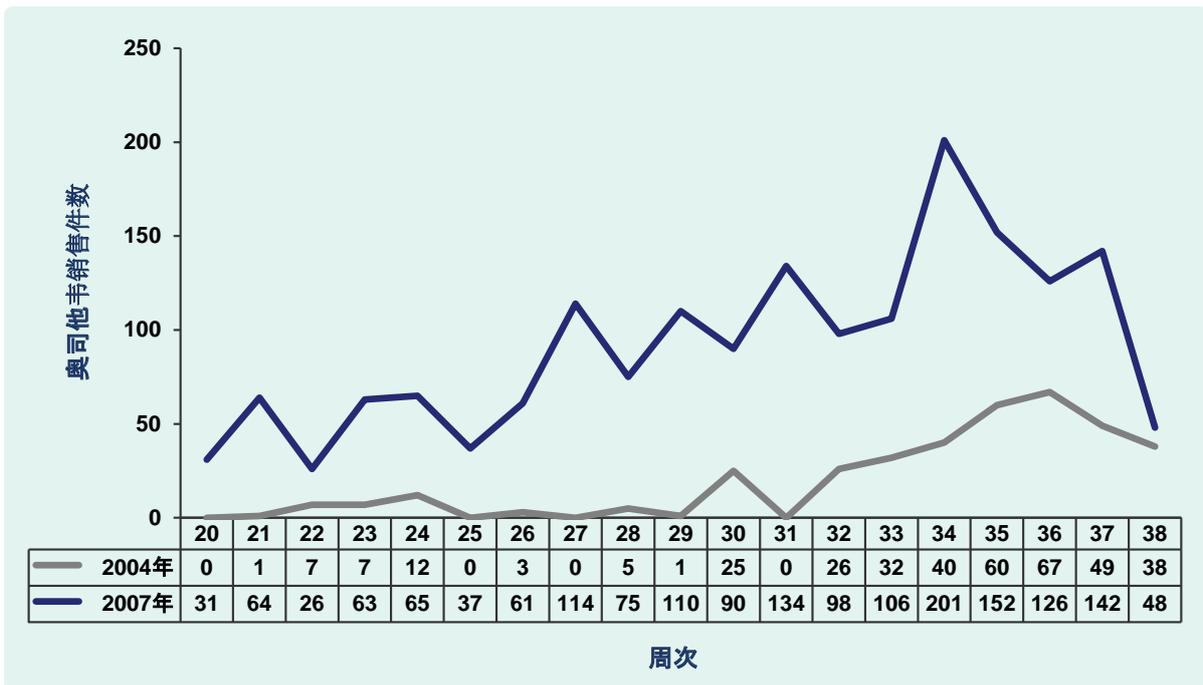
图1. 2006–2010年新西兰不同型别流感病毒IC₅₀值的对数箱线图



* IC₅₀ – 使酶活性降低50%时药物的抑制浓度。

† 箱型盒子表示第1、第2和第3四分位数，上下界线为四分位间距的1.5倍。离群值用“•”表示，均值用“+”表示。粗虚线表示病毒对奥司他韦耐药的阈值，该阈值是所有年份各型别病毒IC₅₀均值的10倍。IC₅₀均值的阈值计算并不包括2008年和2009年的季节性流感病毒A(H1N1)，因为这些年份的所有病毒均对奥司他韦耐药。细虚线为Log₁₀ IC₅₀零轴线。

图2. 2004年和2007年新西兰奥司他韦销售量



体对于病毒的选择性压力，可能会增加耐药出现的可能性^[34]。然而，因为2004–2007年间新西兰奥司他韦的使用量并没有出现大幅度增加，我们不能推断奥司他韦重新分类对耐药性产生的具体影响。日本奥司他韦使用较为广泛，他们的研究没有发现对耐药性产生显著性影响^[35]。

在还没有大量疫苗可供广泛使用之前，奥司他韦对于控制流感大流行病毒的传播和扩散非常重要。在首例A(H1N1)pdm09流感病例出现一年以后，新西兰才有疫苗可用。本研究显示，2009–2010年间的817株A(H1N1)pdm09流感病毒对奥司他韦100%敏感。在流感大流行的早期，新西兰卫生当局调用了部分流感大流行储备奥司他韦(<50 000剂，新西兰卫生部)，该项措施对流感大流行初期的遏制可能起了一定辅助作用。从2010年4月26日新西兰报告首例病例，到2010年6月进入管控阶段即已经建立起了社区传播，中间大概经过了6–7周时间。先前的流行病学模型研究显示，流感大流行期间奥司他韦使用量的增加可能会引发耐药病毒株的产生，但对病毒本身的影响并不大^[36,37]。新西兰奥司他韦的使用量还不太可能达到这些模型研究中的阈值。我们的数据显示，尽管流感大流行期间新西兰动用了奥司他韦储备，A(H1N1)pdm09流感病毒对奥司他韦的耐药性依然保持在较低水平。

需要继续开展流感病毒抗病毒药物耐药性监测，以保证储备的神经氨酸酶抑制剂仍然有效，并为医治流感病人的临床医务人员随时提供神经氨酸酶抑制剂有效性方面的信息。

利益冲突

无申报。

经费

本研究获得新西兰卫生部和新西兰科技创新部部分资金资助。

致谢

新西兰卫生部对全国流感监测提供了经费支持，并允许本研究发表使用相关数据。我们也感谢Darren Hunt对本文稿进行的审阅。我们要特别感谢奥克兰、基督城及怀卡托市的全科医生、护士、公共卫生单位协调员和参与本项研究的病毒学实验室，以及环境科学研究所的国家流感中心。我们也要感谢澳大利亚墨尔本WHO流感参比和研究中心的Aeron Hurt和Ian Barr提供的支持、建议和指导。我们感谢罗氏制药公司为本研

究提供了奥司他韦销售数据。我们也感谢美国CDC通过签订材料转移协议，分享流感病毒RT-PCR方案。研究中使用的MDCK-SIAT1细胞由位于马尔堡菲利普斯大学的M Matrosovich惠赠。

引用本文地址：

Hall R et al. Tracking oseltamivir-resistance in New Zealand influenza viruses during a medicine reclassification in 2007, a resistant-virus importation in 2008 and the 2009 pandemic. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2012, 3(4):75-78. doi: 10.5365/wpsar.2012.3.3.002

参考文献：

- Hurt AC, Ho HT, Barr I. Resistance to anti-influenza drugs: adamantanes and neuraminidase inhibitors. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2006, 4:795–805. doi:10.1586/14787210.4.5.795 pmid:17140356
- Matrosovich MN et al. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *Journal of Virology*, 2004, 78:12665–12667. doi:10.1128/JVI.78.22.12665-12667.2004 pmid:15507653
- Aoki FY et al.; IMPACT Study Group. Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 51:123–129. doi:10.1093/jac/dkg007 pmid:12493796
- Nicholson KG et al.; Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 2000, 355: 1845–1850. doi:10.1016/S0140-6736(00)02288-1 pmid:10866439
- Treanor JJ et al.; US Oral Neuraminidase Study Group. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 2000, 283:1016–1024. doi:10.1001/jama.283.8.1016 pmid:10697061
- Dutkowski R. Oseltamivir in seasonal influenza: cumulative experience in low- and high-risk patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65 Suppl 2:ii11–24. doi:10.1093/jac/dkq012 pmid:20215131
- Hurt AC et al.; WHO Consultation on Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 Virus Resistance to Antivirals. Antiviral resistance during the 2009 influenza A H1N1 pandemic: public health, laboratory, and clinical perspectives. *The Lancet Infectious Diseases*, 2012, 12:240–248. doi:10.1016/S1473-3099(11)70318-8 pmid:22186145
- Minutes of the 34th meeting of the Medicines Classification Committee*. Auckland, New Zealand Medicines Classification Committee, 2006 (<http://www.medsafe.govt.nz/profs/class/mccMin9June06.htm>, accessed 28 November 2012).
- Oseltamivir Report 2006*. Wellington, New Zealand Medicines and Medical Safety Devices Authority, 2007.
- Monto AS et al. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50:2395–2402. doi:10.1128/AAC.01339-05 pmid:16801417

11. Lackenby A et al. Continued emergence and changing epidemiology of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)2009 virus, United Kingdom, winter 2010/11. *Euro Surveillance: European Communicable Disease Bulletin*, 2011, 16(6):19789. pmid:21315056
12. Hurt AC et al. Community transmission of oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza. *The New England Journal of Medicine*, 2011, 365:2541–2542. doi:10.1056/NEJMc1111078 pmid:22204735
13. Yen HL et al. Importance of neuraminidase active-site residues to the neuraminidase inhibitor resistance of influenza viruses. *Journal of Virology*, 2006, 80:8787–8795. doi:10.1128/JVI.00477-06 pmid:16912325
14. Lackenby A et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveillance: European Communicable Disease Bulletin*, 2008, 13:8026. pmid:18445375
15. Meijer A et al.; European Influenza Surveillance Scheme. Oseltamivir-resistant influenza virus A(H1N1), Europe, 2007–08 season. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15: 552–560. doi:10.3201/eid1504.081280 pmid:19331731
16. Dharan NJ et al.; Oseltamivir-Resistance Working Group. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 2009, 301:1034–1041. doi:10.1001/jama.2009.294 pmid:19255110
17. Hurt AC et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antiviral Research*, 2009, 83:90–93. doi:10.1016/j.antiviral.2009.03.003 pmid:19501261
18. Influenza A virus resistance to oseltamivir - 13 June 2008. Geneva, World Health Organization, 2008 (http://www.who.int/influenza/patient_care/antivirals/oseltamivir_summary/en/index.html, accessed 28 November 2012).
19. Huang QS et al. Influenza surveillance and immunisation in New Zealand, 1997–2006. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2008, 2:139–145. doi:10.1111/j.1750-2659.2008.00050.x pmid:19453466
20. Huang QS, Lopez L, Adlam B. Influenza surveillance in New Zealand in 2005. *New Zealand Medical Journal*, 2007, 120:U2581. pmid:17589549
21. Huang Q et al. Surveillance for the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and seasonal influenza viruses - New Zealand, 2009. *MMWR, Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2009, 58:918–921.
22. Matrosovich M et al. Overexpression of the alpha-2, 6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *Journal of Virology*, 2003, 77:8418–8425. doi:10.1128/JVI.77.15.8418-8425.2003 pmid:12857911
23. Ives JA et al. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, 2002, 55:307–317. doi:10.1016/S0166-3542(02)00053-0 pmid:12103431
24. Wetherall NT et al. Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41:742–750. doi:10.1128/JCM.41.2.742-750.2003 pmid:12574276
25. Zambon M, Hayden FG, Global Neuraminidase Inhibitor Susceptibility N. Position statement: global neuraminidase inhibitor susceptibility network. *Antiviral Research*, 2001, 49:147–156. doi:10.1016/S0166-3542(01)00124-3 pmid:11428241
26. Hoffmann E et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, 2001, 146:2275–2289. doi:10.1007/s007050170002 pmid:11811679
27. Hall RJ et al. Pandemic influenza A(H1N1) viruses currently circulating in New Zealand are sensitive to oseltamivir. *Euro Surveillance: European Communicable Disease Bulletin*, 2009, 14:19282. pmid:19643060
28. García J et al. Antiviral resistance in influenza viruses circulating in Central and South America based on the detection of established genetic markers. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2009, 3:69–74. doi:10.1111/j.1750-2659.2009.00072.x pmid:19496844
29. Hauge SH et al. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007–08. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15: 155–162. doi:10.3201/eid1502.081031 pmid:19193257
30. Sheu TG et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, 52:3284–3292. doi:10.1128/AAC.00555-08 pmid:18625765
31. Boltz DA et al. Emergence of H5N1 avian influenza viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors and novel reassortants in Lao People's Democratic Republic. *Journal of General Virology*, 2010, 91:949–959. doi:10.1099/vir.0.017459-0 pmid:20016036
32. Hurt AC et al. Increased detection in Australia and Singapore of a novel influenza A(H1N1)2009 variant with reduced oseltamivir and zanamivir sensitivity due to a S247N neuraminidase mutation. *Euro Surveillance: European Communicable Disease Bulletin*, 2011, 16(23):19909. pmid: 21679678
33. Submission to the Medicines Classification Committee for: oseltamivir (Tamiflu® powder filled capsules, 75mg). *Review of the exemption to allow Pharmacy Prescribing of oseltamivir for treatment of influenza in adults and adolescents during the influenza season in New Zealand*. Roche Products (New Zealand) Limited, 2008 (<http://www.medsafe.govt.nz/profs/class/agen39Tamiflu.doc>, accessed 28 November 2012).
34. Calatayud L et al. Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus infection in England and Scotland, 2009–2010. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17:1807–1815. doi:10.3201/eid1710.110117 pmid:22000349
35. Tashiro M et al.; Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network. Surveillance for neuraminidase-inhibitor-resistant influenza viruses in Japan, 1996–2007. *Antiviral Therapy*, 2009, 14:751–761. doi:10.3851/IMP1194 pmid:19812437
36. Eichner M et al. Antiviral prophylaxis during pandemic influenza may increase drug resistance. *BMC Infectious Diseases*, 2009, 9:4. doi:10.1186/1471-2334-9-4 pmid:19154598
37. Lipsitch M et al. Antiviral resistance and the control of pandemic influenza. *PLoS Medicine*, 2007, 4:e15. doi:10.1371/journal.pmed.0040015 pmid:17253900