

Чувствительность к ремантадину и озелтамивиру вирусов гриппа А, изолированных на территории Республики Беларусь

**ГУНИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ, Минск*

***ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, РФ*

Представлены результаты изучения фенотипической резистентности к ремантадину эпидемических штаммов вируса гриппа А, выделенных на территории страны в 2000-2008гг., и определения генетических маркеров резистентности к ремантадину и озелтамивиру. Показано, что большинство штаммов, отличающихся фенотипической резистентностью к ремантадину, имели мутации в сегменте М2 вирусного генома. Из 13 штаммов гриппа А(Н1N1), выделенных в сезоне 2007-2008гг, 38,5 % имели мутации в N1сегменте генома, ответственные за развитие резистентности к озелтамивиру. Среди штаммов вируса гриппа А(Н1N1), изолированных в предыдущие сезоны, отсутствовали озелтамивир-резистентные штаммы.

Ключевые слова: вирусы гриппа, эпидемические штамм, противовирусная активность, ремантадин, озелтамивир

Современная эпидемиологическая ситуация по гриппу обусловлена одновременным участием в развитии эпидемического процесса двух субтипов вирусов гриппа А (Н1 и Н3) и вируса гриппа В. Кроме того, с 1997 года появились случаи заболевания людей, вызванные новым субтипом вируса гриппа А(Н5N1). Вирусы гриппа с такой антигенной формулой ранее заболеваний у человека не вызывали. В последние годы наблюдается активная циркуляция высоко патогенного вируса гриппа А (Н5N1) среди домашних птиц, что сопровождается заражением людей и высоким уровнем смертности среди заболевших. Это значительно усугубляет эпидемиологическую ситуацию и позволяет экспертам Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) рассматривать вирус гриппа А (Н5N1) в качестве наиболее вероятного кандидата в пандемические вирусы.

Учитывая высокую вероятность возникновения новой пандемии гриппа, эксперты ВОЗ в 2005 году разработали современную классификацию фаз развития пандемии. По определению ВОЗ, мир сегодня находится в 3 фазе развития пандемии - фазе «угрозы пандемии», характеризующейся появлением случаев инфицирования людей новым субтипом вируса гриппа, не сопровождающихся передачей от человека к человеку или с очень редкими случаями передачи инфекции при тесном контакте [14]. В этой ситуации особенно важным является изучение биологических свойств циркулирующих вирусов гриппа, в том числе изучение чувствительности к признанным противогриппозным препаратам. В мире широко используются две группы противогриппозных препаратов: производные адамантанов (ремантадин, амантадин) и ингибиторы нейраминидазы (озелтамивир, занамивир). В нашей стране широкое применение получил ремантадин. Другой противогриппозный препарат - озелтамивир, в виду своей высокой стоимости, применяется относительно редко. Амантадин и ремантадин являются препаратами 1-го поколения. Мишенью для препаратов адамантанового ряда является М2-белок вируса гриппа, который

формирует ионные каналы в вирусной оболочке. Однако использование адамантанов ограничено их влиянием только на вирусы гриппа типа А и отсутствием активности в отношении вируса гриппа В. Также возникает вопрос о целесообразности их применения в связи с появлением большого количества сообщений об увеличении уровня устойчивости к данным препаратам за последние несколько лет. В среднем у 30% лиц, принимавших адамантаны для лечения гриппа, выделяются вирусы, устойчивые к этим препаратам [7]. Опасность распространения устойчивых к адамантину и ремантадину штаммов вируса гриппа А особенно велика в закрытых коллективах, больницах, интернатах, домах престарелых.

Ингибиторы нейраминидазы занамивир и озелтамивир являются препаратами второго поколения, оказывают ингибирующее влияние как на вирусы гриппа А, так и на вирусы гриппа В, угнетая функцию вирусного фермента нейраминидазы, которая отвечает за отщепление остатков сиаловой кислоты от геммаглютинина вновь образованных вирионов. По данным американских авторов, в течение первых 3-х лет клинического применения препаратов этой группы, в мире было выявлено лишь 0,33% резистентных штаммов (8 из 2287) [3]. Но уже через несколько лет появились данные о более широком распространении озелтамивир-резистентных штаммов вирусов гриппа [8,12]. Ситуация значительно изменилась в сезоне 2007-2008гг. В январе 2008г. ВОЗ сообщила о резком увеличении количества штаммов вируса гриппа А(Н1N1), резистентных к озелтамивиру на территории Европы. В отдельных странах их число достигло 64% от общего числа штаммов, выделенных за эпидемический сезон 2007-2008гг [13].

Настоящая работа посвящена изучению фенотипической чувствительности к ремантадину вирусов гриппа А, изолированных на территории РБ в 2000-2008гг на основании определения уровня экспрессии вирусных антигенов методом иммуноферментного анализа (ИФА) и определению генетических маркеров резистентности к ремантадину и озелтамивиру.

Материал и методы исследования

В работе были использованы эпидемические штаммы вирусов гриппа, выделенные на территории страны в 2000-2005гг, полученные из музея института, и штаммы вирусов гриппа, выделенные за период 2005-2008гг.

Изучение чувствительности эпидемических штаммов вирусов гриппа к ремантадину определяли путем сравнительного изучения репродукции вирусов в культуре клеток МДСК в присутствии и без внесения препарата. Оценку противовирусной активности препаратов проводили с помощью ИФА, определяя уровень снижения экспрессии вирусных антигенов. Постановку ИФА проводили после фиксирования клеток 80% ацетоном на фосфатном буфере по методике описанной Леневой И.А. с соавторами [1]. В работе использовали моноклональные антитела к вирусу гриппа А из диагностического набора ВОЗ. В качестве конъюгата использовали антимышинные козы IgG, меченные пероксидазой хрена производства ООО «Сорбент», Россия. Оптическую плотность (ОП) измеряли в иммуноферментном анализаторе АИФ М/340 фирмы «Витязь» (Беларусь) при длине волны 450 нм.

С целью выявления мутаций, обуславливающих резистентность к препаратам адамантанового ряда и озелтамивиру проведен анализ участков генома вирусов, кодирующих гены М2 и N1 соответственно. Экстракцию РНК из суспензии вирусов и реакцию обратной транскрипции проводили с использованием наборов реагентов «Рибо-сорб» и «Реверта-L» (ФГУН ЦНИИЭ, Россия). ПЦР с использованием

специфических праймеров и реагентов производства ФГУН ЦНИИЭ выполнялась на приборе «Терцик» (ДНК-технология, Россия). Секвенирование фрагментов амплификации проводили на базе ФГУН ЦНИИЭ методом "cycle sequence" с набором Genome Lab DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, США) в соответствии с рекомендациями производителя с использованием капиллярного автоматического генетического анализатора CEQTM 8000 (Beckman Coulter, США). Анализ нуклеотидных последовательностей выполнялся с использованием блока программ DNASTAR.

Результаты и обсуждение

Для изучения фенотипической чувствительности к ремантадину было отобрано 42 эпидемических штамма вируса гриппа А, среди которых было 23 штамма вируса гриппа А (H3N2) и 19 штаммов А (H1N1).

Вирусы различались по фенотипической чувствительности к ремантадину, что позволило разделить их на три группы:

- штаммы, обладающие высокой чувствительностью к препарату, процент ингибирования 70 -100%;
- умеренно чувствительные штаммы, процент ингибирования 50 - 70%;
- штаммы со сниженной чувствительностью по отношению к химиопрепарату, процент ингибирования менее 50%.

Согласно литературным данным, вирусы гриппа, резистентные к препаратам адамантанового ряда, имеют мутации в 7 сегменте во второй рамке считывания, кодирующей белок М2. Точечные замены возникают в трансмембранной части домена белка М2 в позициях 26, 27, 30, 31 или 34 [6]. По данным литературы среди адамантан-резистентных вирусов гриппа А, изолированных в мире за период 1995-2005 гг., более 98% содержали одну и ту же замену аминокислоты Ser 31 Asn (серин на аспарагин в положении 31) [4]

Для проведения молекулярно-генетического анализа было отобрано 30 штаммов вирусов гриппа А, характеризующихся различной фенотипической чувствительностью к ремантадину. Сравнительные данные фенотипической и генетической чувствительности проанализированных штаммов вирусов гриппа А к ремантадину приведены в таблице 1.

Таблица 1

Фено- и генотипическая характеристика резистентности штаммов вируса гриппа А к ремантадину

Штамм	Фенотип, па результатах ИФА	Мутации в гене М2
А/Минск/9/2001/(H1N1)	в/ч*	отсутствуют
А/Минск/256/2003/(H1N1)	в/ч	отсутствуют
А/Минск/32/2003/(H1N1)	у/ч**	отсутствуют
А/Минск/30/2003/(H1N1)	с/ч***	отсутствуют
А/Минск/60/2003/(H1N1)	в/ч	отсутствуют
А/Брест/236/2007/(H1N1)	с/ч	Ser 31 Asn
А/Гродно/108/2008/(H1N1)	с/ч	отсутствуют
А/Гродно/110/2008/(H1N1)	у/ч	отсутствуют
А/Минск/118/2008/(H1N1)	с/ч	отсутствуют
А/Минск/124/2008/(H1N1)	в/ч	отсутствуют
А/Минск/125/2008/(H1N1)	с/ч	Ser 31 Asn
А/Минск/132/2008/(H1N1)	в/ч	отсутствуют
А/Минск/142/2008/(H1N1)	в/ч	отсутствуют
А/Минск/156/2008/(H1N1)	с/ч	Ser 31 Asn
А/Гродно/161/2008/(H1N1)	в/ч	отсутствуют
А/Гродно/163/2008/(H1N1)	в/ч	отсутствуют
А/Гродно/166/2008/(H1N1)	в/ч	отсутствуют
А/Минск/179/2008/(H1N1)	в/ч	отсутствуют
А/Минск/211/2008/(H1N1)	в/ч	отсутствуют
А/Минск/65/2005/(H3N2)	с/ч	отсутствуют
А/Минск/87/2007/(H3N2)	у/ч	Ser 31 Asn
А/Минск/93/2007/(H3N2)	с/ч	Ser 31 Asn
А/Ивацевичи/115/2007/(H3N2)	в/ч	отсутствуют
А/Борисов/150/2007/(H3N2)	в/ч	Ser 31 Asn
А/Брест/275/2007/(H3N2)	с/ч	Ser 31 Asn
А/Брест/287/2007/(H3N2)	с/ч	Ser 31 Asn
А/Брест/288/2007/(H3N2)	с/ч	Ser 31 Asn
А/Минск/340/2007/(H3N2)	с/ч	Ser 31 Asn
А/Минск/341/2007/(H3N2)	с/ч	Ser 31 Asn
А/Пинск/348/2007/(H3N2)	с/ч	Ser 31 Asn

Примечание.*в/ч- высокочувствительные,**у/ч- умеренно чувствительные,***с/ч - штаммы со сниженной чувствительностью.

В результате секвенирования фрагмента М2 генома вирусов у 12 из 30 проанализированных вирусов были обнаружены мутации Ser 31 Asn. Среди вирусов гриппа А(Н1N1) сезона 2007-08 гг. генетические маркеры резистентности к ремантадину были обнаружены в 15,4% (2 из 13) изолятов. Вирус гриппа А/Брест/236/2007/(H1N1), выделенный в сезон 2006-2007гг, так же содержал замену Ser 31 Asn в гене М2 белка, в то время как штаммы вируса гриппа данного субтипа, выделенные в предыдущие сезоны, не содержали в своем геноме мутаций, ответственных за развитие резистентности к ремантадину. Из приведенных в таблице 1 данных видно, что у всех штаммов вируса гриппа А(Н1N1), характеризующихся высокой фенотипической чувствительностью к ремантадину отсутствовали генетические маркеры резистентности к данному препарату. Среди штаммов, характеризующихся сниженной фенотипической чувствительностью к ремантадину выявлены штаммы, имеющие замену в положении 31 аспарагин - серин, и штаммы, у которых подобные мутации не обнаружены. Среди вирусов гриппа А(Н3N2) для всех штаммов со сниженной фенотипической чувствительностью и штамма умеренно чувствительного к ремантадину отмечено

наличие мутации Ser 31 Asn. Вирус А/Борисов/150/2007/(H3N2)содержал замену Ser 31 Asn в М2 сегменте генома, хотя и отличался высокой фенотипической чувствительностью. Полученные расхождения между генетической и фенотипической чувствительностью могут быть обусловлены использованием гетерогенной популяции вирусных частиц, полученной при выделении вируса на культуре МДСК, которая могла содержать как чувствительные, так и резистентные вирусные частицы. В условиях эксперимента в присутствии ремантадина могла преимущественно размножиться чувствительная часть популяции, что и обусловило высокую фенотипическую чувствительность.

Примеры аминокислотной последовательности фрагмента М2 гена эпидемических штаммов вируса гриппа А субтипов Н1 и Н3, характеризующихся различной чувствительностью к ремантадину, приведены в таблице 2.

Полученные нами данные совпадают с данными литературы о мировой тенденции снижения чувствительности вирусов гриппа А к препаратам адамантанового ряда. Уровень резистентности к препаратам этой группы среди вирусов гриппа А начал увеличиваться в Азии в сезоне 1998-1999 и заметно возрос в Китае с 57,5% в 2002-2003гг до 73,8% в 2003-2004 гг [4]. В России снижение чувствительности к ремантадину обнаружено в 9,5% в сезоне 2002-2003гг., 38 и 44% в 2004-2005 и 2005-2006гг соответственно [2]. В США уровень резистентности вирусов гриппа А к адамантанам значительно возрос с 1,9% в эпидемическом сезоне 2003-04 до 92% в сезоне 2005-06гг [9]. Это послужило основанием к запрещению использования препаратов адамантанового ряда в сезон 2005-2006 гг [5].

Таблица 2

Аминокислотная последовательность фрагмента М2 гена эпидемических штаммов вируса гриппа А

Штамм	Аминокислотные последовательности штаммов гриппа А(H3N2)	
	Позиция	31
А/Минск/65/2005/(H3N2)	Pro-Leu-Val- Val- Ala-Ala-	Ser-Ile-Ile-Gly-Ile-Leu
А/Минск/93/2007/(H3N2)	Pro-Leu-Val- Val- Ala-Ala-	Asn-Ile-Ile-Gly-Ile-Leu
А/Минск/87/2007/(H3N2)	Pro-Leu-Val- Val- Ala-Ala-	Asn-Ile-Ile-Gly-Ile-Leu
А/Пинск/348/2007/(H3N2)	Pro-Leu-Val- Val- Ala-Ala-	Asp-Ile-Ile-Gly-Ile-Leu
А/Ивацевичи/115/2007/(H3N2)	Pro-Leu-Val- Val- Ala-Ala-	Ser-Ile-Ile-Gly-Ile-Leu
	Аминокислотные последовательности штаммов гриппа А(H1N1)	
	Позиция	31
А/Минск/9/2001/(H1N1)	Ser-Asp- Pro- Leu- Val- Val- Ala-Ala	Ser-Ile-Ile-Gly
А/Минск/256/2003/(H1N1)	Ser-Asp- Pro- Leu- Val- Val- Ala-Ala	Ser-Ile-Ile-Gly
А/Брест/236/2007/(H1N1)	Ser-Asp- Pro- Leu- Val- Val- Ala-Ala	Asn-Ile-Ile-Gly
А/Минск/124/2008/(H1N1)	Ser-Asp- Pro- Leu- Val- Val- Ala-Ala	Ser-Ile-Ile-Gly
А/Минск/156/2008/(H1N1)	Ser-Asp- Pro- Leu- Val- Val- Ala-Ala	Asn-Ile-Ile-Gly

В виду того, что основным препаратом, рекомендованным ВОЗ для лечения людей, инфицированных вирусом гриппа H5N1, является озелтамивир, пристальное внимание в мире уделяется вопросу развития резистентности к ингибиторам нейраминидазы. С этой целью при ВОЗ создана глобальная сеть наблюдения за чувствительностью к ингибиторам нейраминидазы (Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network). Изучение штаммов вируса гриппа, резистентных к ингибиторам нейраминидазы, выявило наличие мутаций в гене нейраминидазы в положениях 119, 152, 274 и 292 активного ферментативного центра нейраминидазы. Выявленные мутации носили субтипоспецифический характер. Замена аргинин на лизин в положении 292 (Arg292Lys) белка нейраминидазы была выявлена у вирусов гриппа субтипа N2 [10]. Вирусы гриппа субтипа N1 содержали замену гистидина на

тирозин в положении 274 (His 274Tyr) [11]. В виду резкого увеличения резистентности к ингибиторам нейраминидазы вирусов гриппа А(Н1N1), циркулировавших на территории Европы в сезоне 2007-2008, несомненный интерес представляет изучение чувствительности к озелтамивиру среди вирусов, циркулировавших на территории нашей страны (таблица 3).

Таблица 3

Наличие генетических маркеров резистентности к озелтамивиру среди вирусов гриппа А (Н1N1)

Штамм	Мутации в гене N1
А/Минск/9/2001/(H1N1)	отсутствуют
А/Минск/256/2003/(H1N1)	отсутствуют
А/Минск/32/2003/(H1N1)	отсутствуют
А/Минск/30/2003/(H1N1)	отсутствуют
А/Минск/60/2003/(H1N1)	отсутствуют
А/Брест/236/2007/(H1N1)	отсутствуют
А/Гродно/108/2008/(H1N1)	His 274Tyr
А/Гродно/110/2008/(H1N1)	отсутствуют
А/Минск/118/2008/(H1N1)	отсутствуют
А/Минск/124/2008/(H1N1)	His 274Tyr
А/Минск/125/2008/(H1N1)	отсутствуют
А/Минск/132/2008/(H1N1)	отсутствуют
А/Минск/142/2008/(H1N1)	His 274Tyr
А/Минск/156/2008/(H1N1)	отсутствуют
А/Гродно/161/2008/(H1N1)	отсутствуют
А/Гродно/163/2008/(H1N1)	His 274Tyr
А/Гродно/166/2008/(H1N1)	отсутствуют
А/Минск/179/2008/(H1N1)	отсутствуют
А/Минск/211/2008/(H1N1)	His 274Tyr

Анализ аминокислотной последовательности гена NA исследованных нами штаммов вируса гриппа А субтипа Н1N1 позволил выявить генетический маркер резистентности к озелтамивиру у 38,5% (5 из 13) изолятов субтипа Н1N1 2008 года. Среди вирусов, изолированных в предыдущие сезоны, генетические маркеры резистентности к озелтамивиру отсутствовали. Примеры аминокислотной последовательности фрагмента гена нейраминидазы эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н1N1)приведены в таблице 4.

Таблица 4.

Аминокислотная последовательность фрагмента гена нейраминидазы эпидемических штаммов вируса гриппа А(Н1N1)

Штамм	Аминокислотные последовательности штаммов гриппа А(Н1N1)
	Позиция 274
А/Минск/9/2001/(H1N1)	Glu-Leu-Asn-Ala-Pro-Asn-Phe-His-Tyr-Glu-Glu-Cys-Ser-Cys
А/Минск/256/2003/(H1N1)	Glu-Leu-Asn-Ala-Pro-Asn-Phe-His-Tyr-Glu-Glu-Cys-Ser-Cys
А/Брест/236/2007/(H1N1)	Glu-Leu-Asn-Ala-Pro-Asn-Phe-His-Tyr-Glu-Glu-Cys-Ser-Cys
А/Минск/124/2008/(H1N1)	Glu-Leu-Asn-Ala-Pro-Asn-Phe-Tyr-Tyr-Glu-Glu-Cys-Ser-Cys
А/Минск/156/2008/(H1N1)	Glu-Leu-Asn-Ala-Pro-Asn-Phe-His-Tyr-Glu-Glu-Cys-Ser-Cys

Согласно сообщениям ВОЗ от 20 августа 2008г. в сезоне 2007-2008гг в мире среди циркулирующих штаммов вирусов гриппа наблюдался различный уровень резистентности к ингибиторам нейраминидазы, который колебался от 0 до 67% [15]. В целом в мире 16% изолятов гриппа H1N1 характеризовались наличием резистентности к озелтамивиру. На территории Европейского региона уровень резистентности был значительно выше, по сравнению с остальными регионами, в среднем здесь в прошедшем сезоне было выявлено 25% озелтамивир-резистентных штаммов вируса гриппа А(H1N1). Наибольший уровень резистентности к ингибиторам нейраминидазы был зарегистрирован в Норвегии и достиг 67%. Высокий уровень резистентности был обнаружен в России(45%), Франции(47%), Бельгии (53%) Украине(34%) [15].

Выводы

1. Циркулирующие на территории республики вирусы гриппа А различаются по чувствительности к ремантадину и озелтамивиру. Большинство вирусов, отличающихся фенотипической резистентностью к ремантадину, содержали мутации в гене M2 белка Ser 31 Asp. Выявленное несоответствие некоторых данных фенотипической и генетической чувствительности к ремантадину может быть обусловлено использованием в качестве материала для исследования популяции вирусных частиц, не подвергавшихся клонированию.
2. Несмотря на ограниченное использование в нашей стране ингибиторов нейраминидазы (озельтамивир) 38,5% выделенных вирусов сезона 2007-2008 обладали генетической резистентностью к препаратам данной группы. Это может быть связано с особенностями географического расположения нашей страны, через территорию которой проходит большое количество транспортных потоков, что может способствовать быстрому появлению на территории республики актуальных и резистентных штаммов вирусов гриппа.
3. Полученные нами данные подчеркивают необходимость усиления мониторинга циркулирующих вирусов гриппа, выделения и изучения чувствительности к применяемым противогриппозным препаратам как в эпидемический сезон, так и в не эпидемический период для назначения адекватной терапии и прогнозирования развития эпидемической ситуации.

Авторы выражают благодарность за проведение работы по секвенированию эпидемических штаммов вируса гриппа сотрудникам Научно-производственной лаборатории ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии».

Литература

1. Ленева, И. А., Фадеева, Н. И., Федякина, И. Т. Применение иммуноферментной индикации вирусспецифических антигенов в изучении нового противогриппозного препарата арбидола // Химико-фармацевтический журнал. 1994. Т. 28. № 9. С. 4-8.
2. Ротанов, М., Гребенникова, Т. В., Бурцева, Е. И., Шевченко, Е. С. Молекулярно-генетический анализ эпидемических штаммов вируса гриппа А, характеризующихся различной чувствительностью к римантадину, на основе нуклеотидной последовательности M2 белка // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2007. Т. 9. № 4. С. 369-374.
3. Arnold S. Monto, Jennifer L. McKimm-Breschkin, et all. Detection of nfluenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use // Antimicrobial Agentsand and Chemotherapy. 2006. Vol. 50. № 7. P. 2395-2402.

4. Bright, RA, Medina, MJ, Xu, X et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern // *Lancet*. 2005; 366:1175-1181.
5. CDC Prevention and Control of Influenza // *MMWR*. 2006. Vol. 55. P. 44-46.
6. Hay, A.J, Wolstenholme, A.J, Skehel, J.J, Smith, M.H. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine // *The EMBO Journal*. 1985. Vol. 4. № 11. P. 3021-3024.
7. Hayden, FG, Belshe, R.B, Clover, RD, Hay, A.J et al. / Emergence and apparent transmission of rimantadine-resistant influenza A virus in families // *N Engl J Med*. 1989; 321:1696-1702.
8. Kiso, M, Mitamura, K, Sakai-Tagawa, Y et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study // *Lancet*. 2004. Vol. 364. P. 759-765.
9. Rick.A, Bright, David.K., Shay, Bo Shu et al. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States // *JAMA*. 2006; 295:891-894.
10. Tai, CY, Escarpe, PA, Sidwell, RW, et al. Characterization of human influenza virus variants selected in vitro in the presence of the neuraminidase inhibitor GS 4071 // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998. Vol. 42. P. 3234-3241.
11. Wang, MZ, Tai, CY, Mendel, DB. Mechanism by which mutation at His274 alter sensitivity of influenza A virus N1 neuraminidase to oseltamivir carboxylate and zanamivir // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002. Vol. 46. P. 3809-3816.
12. Ward, P, Small, I, Smith, J, Suter, P, Dutkowski, R. Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic // *J Antimicrob Chemother*. 2005;55: Suppl 1:i5-i21.
13. *Weekly Epidemiological Record*. 2008 .Vol. 83. P. 81-88.
14. WHO global influenza preparedness plans: the role of WHO and recommendations for national measures before and during pandemics. Geneva :WHO, 2005.
15. WHO. Influenza A(H1N1) virus resistance to oseltamivir - 2008 influenza season, southern hemisphere / WHO, 20 August 2008.[Electronic resource]. - 2008. - Mode of access:http://www.who.int/csr/disease/influenza/h1n1_table/en/index.html. - Date of access: 22.08.2008.