

ノート

## 広島県における新型インフルエンザオセルタミビル耐性 H275Y 株の 検出状況 (2010/11年シーズン)

高尾 信一, 島津 幸枝, 重本 直樹, 谷澤 由枝, 福田 伸治, 松尾 健

### Detection of Oseltamivir-resistant H275Y Influenza A (H1N1)pdm in Hiroshima Prefecture (2010/11 Influenza Season)

SHINICHI TAKAO, YUKIE SHIMAZU, NAOKI SHIGEMOTO, YUKIE TANIZAWA,

SHINJI FUKUDA and TAKESHI MATSUO

(Received September 22, 2011)

A total of 84 influenza A(H1N1)pdm strains that were isolated from November 2010 to March 2011 in Hiroshima Prefecture were used to investigate the frequency of oseltamivir-resistant marker H275Y by single nucleotide polymorphism analysis using the TaqMan real-time RT-PCR assay. Six of 84 strains (7.1%) had resistant marker 275Y, and the results of nucleotide sequencing of the oseltamivir-resistant strains indicated that they had a mutated amino acid, into Tyrosine (Y) from Histidine (H), at position 275. In addition, all of these strains that had 275Y marker had acquired resistance to oseltamivir and peramivir from the results of drug susceptibility testing.

Key words : Influenza A(H1N1)pdm, oseltamivir-resistant, H275Y, I223R

#### はじめに

2009年にメキシコ、北米で発生した新型インフルエンザウイルス [influenza A (H1N1)pdm, 以下 A(H1)pdm と略す] は、その後日本を含む世界中に広がった [1]. A(H1)pdm は、発生当初から M2 阻害薬であるアマンタジンやリマンタジンに耐性を獲得したウイルスであったことから、WHO では新型インフルエンザの治療薬として、ウイルスのノイラミニダーゼ (NA) 蛋白を標的とするオセルタミビルやザナミビルを推奨している [2]. 世界各国で分離された A(H1)pdm 株のほとんどは、それらの薬剤に対して感受性であるが、散発的に NA に特徴的なアミノ酸変異 (NA 遺伝子の275番目のアミノ酸が Histidine : H から Tyrosine : Y への変異, 以下, H275Y と略す) を有するオセルタミビル耐性株が検出されている [3, 4]. 国立感染症研究所と全国地方衛生研究所では A(H1)pdm の出現を受けて、2009年9月から NA 耐性株の日本国内での発生状況のサーベイランスを開始、継続している [4]. その結果、2010年11月~2011年3月の間に、広島県内の患者から、合計6株の H275Y A(H1)pdm 株が検出されたので、その概要を報告する。

#### 材料および方法

##### 1 対象ウイルス株

2010年11月~2011年3月末までの間に、広島県感染症発生動向調査事業等によって、インフルエンザが疑われた患者から MDCK 細胞を用いて分離された182株の A(H1)pdm 株のうち、84株を対象として薬剤耐性検査を実施した (重症サーベイランス患者から分離された1株以外は、無作為に対象株を選定した)。

##### 2 薬剤耐性 A(H1)pdm 株の検出

TaqManリアルタイム RT-PCR 法による H275Y マーカーの検出は、2010年11月22日付けで国立感染症研究所から示された「H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出法実験プロトコール (2010年11月 Ver.1)」に従って実施した。

##### (1) ウイルス RNA の抽出

QIAamp Viral RNA Min Kit (QIAGEN 社) を用いて A(H1)pdm 株の MDCK 細胞培養上清からウイルス RNA を抽出した。また、培養上清の赤血球凝集価が 8 HA 以上あったものについては、培養上清を 10,000rpm で遠心し、細胞成分を除いた上清を滅菌精製水で 10 倍希釈したものをウイルス RNA として用いた。

## (2) プライマーおよびプローブ

使用したプライマーとプローブは、耐性株検出法実験プロトコールに示されたものを用いた。それらの塩基配列等は、以下のとおりである。

プライマー

H1N1NA-F690-719 5'-ATGTGCATGTGTAAATG  
GTTCTTGCTTTAC-3'

H1N1NA-R847-872 5'-ACACATGTGATTTCACT  
AGAATCAGG-3'

プローブ

FAM-274Ya-swH1N1-F823-835 5'(FAM)-TACTA  
TGAGGAAT-(MGB)-3'

VIC-H274a-swH1N1-F823-835 5'(VIC)-CACTAT  
GAGGAAT-(MGB)-3'

## (3) リアルタイム RT-PCR 反応

リアルタイム RT-PCR には、LightCycler 480 (Roche 社) を用いた。反応試薬としては、QuantiTect Virus+Rox Vial Kit (QIAGEN 社) を用いた。反応条件は、1 検体あたり 5 × Master Mix 4.0 μl, 40 × プライマー・プローブ Mix 0.5 μl, QuantiTect Virus RT-Mix 0.2 μl, RNase free Water 13.1 μl, 抽出 RNA 2.0 μl の割合で混合したものを、50℃ 20分、95℃ 5分の反応の後、95℃ 15秒、56℃ 45秒の反応サイクルを45回繰り返した。なお、1 回の検査ごとに、国立感染症研究所から分与された耐性株陽性コントロール RNA (275Y コントロール) と陰性コントロール RNA (H275 コントロール) を、耐性株検出法実験プロトコールに従って、20倍、200倍、2000倍に希釈して検査に用いた。

## (4) Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 解析

リアルタイム RT-PCR 反応の終了後、LightCycler 480に付属する Endpoint Genotyping 解析用のソフトウェアを用いてオセルタミビル感受性マーカー (H275) と耐性マーカー (275Y)、あるいは、それらの混合 (H275/275Y mixture) の有無を判定した。

## 3 NA 遺伝子の塩基配列決定と薬剤マーカーの確認

OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN 社) を用いた RT-PCR 法により、NA 遺伝子の290番目~1130番目の塩基を増幅した。この増幅産物について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。決定した塩基配列の情報から、NA 遺伝子の823~825番目および667~679番目の塩基から翻訳されるアミノ酸の種類を推定した。

なお、OneStep RT-PCR に用いたプライマーは国立感染症研究所から示されたもので、塩基配列は以下のとおりである。

Swine N1-290-307F 5'-GGGCTATATACAGTA  
AAG -3'

Swine N1-1130-1111R 5'-GGATCCCAAATCATC  
TCAAA -3'

## 4 薬剤感受性試験

抗インフルエンザ薬であるオセルタミビル、ザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルに対する A(H1)pdm 株の薬剤感受性について、化学発光法である NA-Star ノイラミニダーゼ阻害薬耐性インフルエンザ検出キット (Applied Biosystems 社) を用いて測定した [5]。なお、この試験は国立感染症研究所インフルエンザ研究センター第1室において実施された。

## 結 果

### 1 薬剤マーカー H275Y の検出状況

TaqMan RT-PCR 検査と、その後の SNP 解析により、対象とした84株の A(H1)pdm 株のうち、6株 (7.1%) が275Y 耐性マーカーを有する株であることが判明した。残りの78株は、いずれも薬剤感受性マーカーである H275を有する株であった。また、H275 と275Y の両方が混合している H275/275Y mixture を示す株は検出されなかった。Fig. 1に275Y 耐性マーカーを有していた6株 [A/Hiroshima/17/2011 (以下、Hiroshima は H と略す)、A/H/24/2011, A/H/45/2011, A/H/49/2011, A/H/55/2011, A/H/66/2011] と、H275感受性マーカーを有していた代表的な5株 (A/H/50/2011, A/H/60/2011, A/H/65/2011, A/H/100/2011, A/H/101/2011) の SNP 解析結果を示した。

### 2 耐性マーカー275Y が検出された患者の概要

275Y が検出された6名の患者の概要を Table 1 に示した。ウイルス検査用の検体を採取される時点で、1名 [患者番号 (以下 No. と略す) 2] がオセルタミビルの投与を受けており、別の1名 (No. 1) はザナミビルの、患者番号4, 5の2名では、ペラミビルの投与を受けていた。いずれの抗インフルエンザ薬も投与されなかった患者は2名 (No. 3, 6) であった。また、患者6名中3名 (No. 3, 5, 6) では、当該患者の発症時期に家族等もインフルエンザを発症しており、そのうちの2名 (No. 3, 6) では、家族等に抗インフルエンザ薬が投与されていた。

### 3 耐性マーカー275Y を示した A(H1)pdm 株の薬剤感受性試験

SNP 解析により耐性マーカー275Y を有することが明

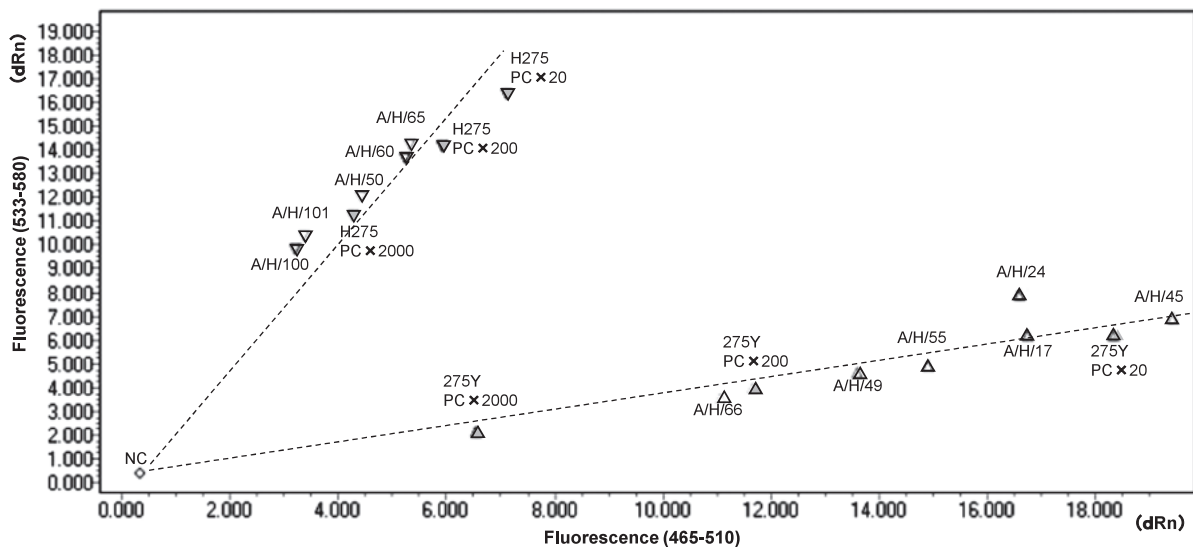


Fig.1. Detection of anti-influenza drug marker H275Y by single nucleotide polymorphism assay.

Abbreviation: A/H/24 = A/Hiroshima/24/2011, PC x 20 = positive control and dilution, NC = negative control

Table 1. Summary of patients with isolated influenza A (H1N1) pdm with drug-resistance marker 275Y

Patient No.	Influenza A (H1N1) pdm strain	Age (Sex)	Date of onset	Date of sample collection	Existence of anti-influenza drug (Date or period of starting medication)	Other information
1	A/Hiroshima/17/2011	11y 9m (M)	Jan-18-2011	Jan-18-2011	Yes : Zanamivir (Jan-18)	No anti-influenza drug was administered to the family of the patient.
2	A/Hiroshima/24/2011	1y 8m (F)	Jan-7-2011	Jan-14-2011	Yes : Oseltamivir (From Jan-7 to Jan-13)	No anti-influenza drug was administered to the family of the patient.
3	A/Hiroshima/45/2011	54y 5m (M)	Feb-13-2011	Feb-14-2011	No	Relatives who visited the patient's house from Feb-11 to Feb-12 were being administered oseltamivir.
4	A/Hiroshima/49/2011	4y 5m (F)	Jan-31-2011	Feb-4-2011	Yes : Peramivir (Jan-31)	No anti-influenza drug was administered to the family of the patient.
5	A/Hiroshima/55/2011	4y 1m (M)	Feb-6-2011	Feb-9-2011	Yes : Peramivir (Feb-9)	Coinciding with the onset in the patient, another family member developed influenza. However, it is unclear whether anti-influenza drugs had been administered to him/her.
6	A/Hiroshima/66/2011	4y 6m (M)	Feb-15-2011	Feb-23-2011	No	To his father, oseltamivir was administered from Feb-15 to Feb-17 and peramivir was administered on Feb-17.

Table 2. Results of anti-influenza drug susceptibility testing of influenza A (H1N1) pdm strains in 2010/2011 season.

Date of susceptibility testing <sup>a)</sup>	Virus strain	Passage history	Date of sample collection	Oseltamivir resistance marker	50% inhibitory concentration (nM)			
					Oseltamivir	Peramivir	Zanamivir	Laninamivir
Feb-8-2011	A/Chiba/1017/2009 <sup>b)</sup>			275Y	98.94	11.48	0.44	0.92
	A/Chiba/1016/2009 <sup>c)</sup>			H275	0.24	0.11	0.40	0.46
	A/Hiroshima/17/2011	MDCK-3	Jan-18-2011	275Y	69.96	8.70	0.67	1.16
	A/Hiroshima/24/2011	MDCK-3	Jan-14-2011	275Y	75.97	5.93	0.86	0.83
Mar-8-2011	A/Chiba/1017/2009 <sup>b)</sup>			275Y	105.62	11.3	0.42	0.86
	A/Chiba/1016/2009 <sup>c)</sup>			H275	0.30	0.07	0.46	0.4
	A/Hiroshima/49/2011	MDCK-3	Feb-4-2011	275Y	112.52	9.08	0.43	0.90
	A/Hiroshima/55/2011	MDCK-3	Feb-9-2011	275Y	87.17	9.11	0.48	0.96
Mar-24-2011	A/Chiba/1017/2009 <sup>b)</sup>			275Y	189.89	23.87	0.46	0.32
	A/Chiba/1016/2009 <sup>c)</sup>			H275	0.61	0.06	0.27	0.15
	A/Hiroshima/45/2011	MDCK-1	Feb-14-2011	275Y	193.53	23.90	0.37	0.31
Mar-28-2011	A/Chiba/1017/2009 <sup>b)</sup>			275Y	100.66	15.14	0.43	0.89
	A/Chiba/1016/2009 <sup>c)</sup>			H275	0.31	0.12	0.36	0.31
	A/Hiroshima/66/2011	MDCK-2	Feb-15-2011	275Y	105.91	12.42	0.41	0.66

a) Susceptibility testing was done with use of chemiluminescent assay by NA-STAR detection kit, Applied Biosystems. (This testing was conducted at the Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Japan.)

b) Susceptible reference strain with H275 marker

c) Resistant reference strain with 275Y marker

らかになった6株のA(H1)pdm株について、4種類の抗インフルエンザ薬に対する薬剤感受性試験を実施した結果をTable 2に示した。

対象となったA(H1)pdm株6株は、いずれもオセルタミビルとペラミビルに対して275Y耐性参照株(A/Chiba/1017/2009)と同程度の薬剤耐性(IC50値)を示した。一方、ザナミビルとラニナミビルに対しては、いずれの株も感受性であった(Table 2)。

#### 4 A(H1)pdm株のNA遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列

耐性マーカー275Yを有する6株のA(H1)pdm株と、感受性マーカーH275を有していた1株(A/H/60/2011)について、NA遺伝子の290~1130番目の塩基を決定するとともに、アミノ酸配列を推定した。Fig. 2には、決定した塩基配列の一部(655~684番目, 811~840番目)と、その塩基配列に対応するアミノ酸配列(219~228番目, 271~280番目)を示した。

感受性マーカーH275を有するA/H/60/2011株では、823~825番目の塩基がCACであり、その結果、推定されるアミノ酸はHistidine(H)であった(Fig. 2A)。一方、耐性マーカー275Yを有していた6株では、この部分の塩基はTAC、アミノ酸はTyrosine(Y)であることが確認された(Fig. 2B)。また、667~679番目の塩基については、いずれの株もATAであり、翻訳される223番目のアミノ酸はIsoleucine(I)であった(Fig. 2)。

### 考 察

2009年に発生したA(H1)pdmの日本国内における流行は、2010年4月には一旦終息したが、同年11月から再び流行が起り、従来の季節性インフルエンザの流行

パターンと同様に、翌年の1月をピークとして3月には終息した[6]。我が国では、インフルエンザ患者の治療に、オセルタミビルをはじめとする抗インフルエンザ薬の使用が積極的に行われていることもあり、世界最大のオセルタミビル使用国となっている[7]。今後、オセルタミビル耐性株が流行の主流になれば、医療機関における治療方針の見直しが必要となると思われる。そのため、日本国内における薬剤耐性株の発生情報を迅速に把握し、自治体や医療機関に速やかに情報提供するために、2009年9月から国立感染症研究所と各地方衛生研究所が共同で抗インフルエンザ薬耐性株のサーベイランスを開始した[4]。このサーベイランスの検査方法については、2009/10年シーズンはNA遺伝子の部分シーケンスによって薬剤マーカーH275Yを確認していた[8]。ところが、患者から分離されるA(H1)pdm株を調べてみると、NA遺伝子275番目のアミノ酸がHであるウイルスとYであるウイルスが混在している株(H275/275Y mixture)の存在が明らかとなってきた[9]。そのため、2010/11年シーズンからは、患者から分離されたウイルスのNA遺伝子275番目のアミノ酸が、HかY、あるいはH275/275Y mixtureであるのかを、TaqMan RT-PCRを利用したSNP解析を用いて判定する検査プロトコールに変更された。広島県においても、この方法に従って2010年11月から2011年3月までの間に分離された84株のA(H1)pdm株を検査したところ、その内の6株が275Y耐性マーカーを示す株であり、ウイルスの塩基配列の解析結果でも、いずれも275番目のアミノ酸がHからYへと変異していることが確認された(Fig. 1, 2)。

275Y耐性マーカーを有するA(H1)pdm株が分離された6名の患者についてみると、Table 1に示したNo. 2の患者では、検体が採取された1月14日以前に7

(A)	655								684	811									840	
A/Hiroshima/60/2011	TGG	AGA	AAC	AAT	ATA	TTG	AGA	ACA	CAA	GAG	GCC	CCT	AAT	TAT	CAC	TAT	GAG	GAA	TGC	TCC
	W	R	N	N	I	L	R	T	Q	E	A	P	N	Y	H	Y	E	E	C	S
	219				223				228	271				275					280	
(B)	655								684	811									840	
A/Hiroshima/17/2011	TGG	AGA	AAC	AAT	ATA	TTG	AGA	ACA	CAA	GAG	GCC	CCT	AAT	TAT	TAC	TAT	GAG	GAA	TGC	TCC
A/Hiroshima/24/2011	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
A/Hiroshima/45/2011	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
A/Hiroshima/49/2011	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
A/Hiroshima/55/2011	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
A/Hiroshima/66/2011	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	W	R	N	N	I	L	R	T	Q	E	A	P	N	Y	Y	Y	E	E	C	S
	219				223				228	271				275					280	

Fig.2. The nucleotide sequence (nucleotide No.665—No.684 and No.811—No.840) of influenza A(H1N1)pdm NA gene and translated amino acid sequence. (A)Nucleotide and amino acid sequences of representative strain with H275 marker that was susceptible to anti-influenza drug. (B) Nucleotide and amino acid sequences of six resistant strains with 275Y marker that were resistant to anti-influenza drug.



日間オセルタミビルが投与されており、かつ、家族等に抗インフルエンザ薬を服用していた者がいないことから、オセルタミビルの服用によって耐性ウイルスが出現したと考えられる。一方、No. 4の患者については、2月4日に検体が採取されているが、それより4日前の1月31日にペラミビルが投与されていた。ペラミビルについては、オセルタミビル同様に275Y耐性マーカーを有する耐性ウイルスが出現することが知られており [10]、この患者についても、家族等に抗インフルエンザ薬を服用していた者がいないことから、ペラミビル投与が原因で耐性ウイルスが出現したと考えられる。一方、No. 3とNo. 6の患者については、いずれも患者自身には抗インフルエンザ薬の投与歴はなかったものの、発症日ないし、その数日前に、家族等がインフルエンザの治療のために、オセルタミビル、あるいはペラミビルが投与されていた。従って、この2名の患者については、家族等から耐性ウイルスが感染した可能性も考えられる。残りの2名の患者 (No. 1, 5) については、患者自身にはザナミビル、あるいはペラミビルの投与歴があるものの、検体採取日が薬剤投与日と同じであることから、投与された薬剤が原因で耐性ウイルスが出現したか否かについては判断できなかった。また、他のインフルエンザ患者から耐性ウイルスが感染した可能性についても、それを積極的に示唆する情報は得られなかった。

今回示した、275Y耐性マーカーを保有する6株の耐性株は、薬剤感受性試験の結果 (Table 2) から、いずれもオセルタミビルだけでなく、ペラミビルに対しても薬剤耐性を獲得していた。275Y耐性株については、オセルタミビルとペラミビル間で交叉耐性を示すことが報告されており [10]、それらの6株の耐性株については、オセルタミビルあるいはペラミビルの投与により、使用されていない薬剤に対しても交叉耐性を獲得したものと考えられた。なお、それら6株はいずれも、ザナミビルとラニナミビルに対しては薬剤感受性であった。

抗インフルエンザ薬に対する耐性を示すマーカーとして、H275Yに加えてI223Rの部分のアミノ酸置換が生じると、オセルタミビルやペラミビルに対して高い耐性を獲得するだけでなく、ザナミビルに対しても耐性を獲得することが報告されている [11-13]。そのため、275Y耐性マーカーを有していた6株について、I223Rに該当する部分の塩基配列を直接確かめることでI223Rの変異の有無についても調べてみたが、いずれの株もI223Rの変異は認められず (Fig. 2)、また薬剤感受性試験の結果でもザナミビルに対して感受性を示していた (Table 2)。

今回我々が調べた結果では、広島県における2010/11年シーズン中の275Y耐性株の出現頻度は7.1%であり、その割合は2009/10年シーズンの0.64% [8] に比較し

て高くなっている。また、2010/11年シーズンにおける日本国内全体での頻度の2.2% [9] と比較しても高い割合であった。2011/12年シーズンにおいても、この耐性ウイルス出現の頻度がさらに高くなるのか否かについて、引き続き監視する必要がある。

## 謝 辞

薬剤感受性試験の実施、並びにTaqManリアルタイムRT-PCR法に関してご助言頂いた、国立感染症研究所インフルエンザ研究センター第1室の先生方に深謝致します。

## 文 献

- [1] Novel swine-origin influenza A(H1N1) virus investigation team, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A(H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 2009;360(25):2605-2615.
- [2] WHO Global Alert and Response [internet]. WHO guidelines for pharmacological management of pandemic (H1N1) 2009 influenza and other influenza viruses [cited 2011 Sept. 12]. Available from:[http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1\\_use\\_antivirals\\_20090820/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_use_antivirals_20090820/en/index.html)
- [3] Hurt AC, Deng YM, Ernest J, Caldwell N, Leang L, Iannello P, Komadina N, Shaw R, Smith D, Dwyer DE et al. Oseltamivir-resistant influenza viruses circulating during the first year of the influenza A(H1N1) 2009 pandemic in the Asia-Pacific region, March 2009 to March 2010. *Euro surveill.* 2011;16(3):1-8.
- [4] 国立感染症研究所インフルエンザ研究センター第1室, (独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源情報部門, 地方衛生研究所. <速報>新型インフルエンザ (A/H1N1 pdm) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況 [第1報]. 病原微生物検出情報. 2010; 31(2):49-53.
- [5] Buxton RC, Edwards B, Juo RR, Voyta JC, Tisdale M, Bethell RC. Development of a sensitive chemiluminescent neuraminidase assay for the determination of influenza virus susceptibility to zanamivir. *Anal Biochem.* 2000;

- 280(2):291-300.
- [6] Infectious Agents Surveillance Report [internet]. インフルエンザウイルス (季節性+ AH1 pdm) 分離・検出状況 2010年第36週～2011年第19週 [cited 2011 Sept. 12]. Available from:<http://idsc.nih.gov/iasr/influ10.html>
- [7] 国立感染症研究所インフルエンザ研究センター第1室, 全国地方衛生研究所, (独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源情報部門. <速報>新型インフルエンザ (A/H1N1 pdm) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況 [第2報]. 病原微生物検出情報. 2010;31(6):22-27.
- [8] 高尾信一, 島津幸枝, 重本直樹, 福田伸治, 谷澤由枝, 竹田義弘, 桑山勝, 大原祥子, 妹尾正登, 松尾健. 広島県において実施した新型インフルエンザウイルス検査と, 患者から検出されたウイルスの性状 (2009年4月～2010年3月). 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2010; 18:21-28.
- [9] Infectious Agents Surveillance Report [internet]. インフルエンザウイルス分離・検出速報 2010/11シーズン [cited 2011 Sept. 12]. Available from:<http://idsc.nih.gov/iasr/influ.html#taiseikabu>
- [10] 高下恵美, 江島美穂, 藤崎誠一郎, 金南希, 岸田典子, 徐紅, 菅原裕美, 伊東玲子, 土井輝子, 田代真人, 他. <速報>ペラミビル治療患者からのH275Y耐性ウイルス検出事例報告. 病原微生物検出情報. 2011;32(3):16-18.
- [11] Hurt AC. Antiviral drug resistance in seasonal and pandemic influenza. *Microbiol Aust.* 2011;32(1):26-28.
- [12] Nguyen H, Fry AM, Loveless PA, Klimov AI, Gubareva LV. Recovery of a multidrug-resistant strain of pandemic influenza A 2009 (H1N1) virus carrying a dual H275Y/I223R mutation from a child after prolonged treatment with oseltamivir. *Clin Infect Dis.* 2010;51(8):983-984.
- [13] van der Vries E, Stelma FF, Boucher CAB. Emergence of a multidrug-resistant pandemic influenza A(H1N1) virus. *N Eng J Med.* 2010; 363(14):1381-1382.