



## Infezioni da virus dell'influenza aviaria negli esseri umani\*

Samson S.Y. Wong, MRCPATH; Kwok-yung Yuen, MD

Studi sieroepidemiologici e virologici dal 1889 hanno suggerito che le pandemie di influenza umana erano causate dai sottotipi H1, H2 e H3 dei virus influenzali di tipo A. Se non fosse per l'epidemia aviaria da virus A/H5N1 del 1997 a Hong Kong in Cina, il sottotipo H2 sarebbe il probabile candidato per la prossima pandemia. Comunque, a differenza delle precedenti epidemie nel pollame di influenza aviaria altamente patogenica dovute al virus H5 che erano state controllate grazie all'abbattimento con o senza vaccinazione, il virus A/H5N1 genotipo Z, circolante al momento attuale, sta diffondendosi dalla Cina meridionale ad altre parti del mondo. Si ritiene che gli uccelli migratori e, meno probabilmente, il commercio di uccelli stiano globalizzando l'epidemia di influenza aviaria A/H5N1 nel pollame. Sono stati riportati più di 200 casi di infezione da virus dell'influenza aviaria negli esseri umani dovuti ai sottotipi A/H5, A/H7 e A/H9 principalmente come risultato di trasmissione pollame-uomo con un tasso di mortalità > 50% per le infezioni da A/H5N1. Un virus mutante o ricombinante in grado di trasmettere efficacemente l'infezione da uomo a uomo potrebbe scatenare un'altra pandemia di influenza. Il recente isolamento di questo virus in sedi extrapolmonari nei casi di malattia umana suggerisce come l'elevata fatalità di questa infezione possa essere qualcosa in più del solo risultato di una tempesta citochinica scatenata dalla malattia polmonare. L'insorgere di resistenza alle adamantine (amantadina e rimantadina) e, recentemente, all'oseltamivir, insieme al fatto che i vaccini per l'H5N1 sono ancora allo stadio di sviluppo di studio clinico di fase I, causa una forte preoccupazione. Inoltre, il possibile tipo virale pandemico potrebbe avere una scarsa immunogenicità crociata con il tipo del vaccino valutato attualmente. L'utilità e l'importanza relative delle precauzioni per la trasmissione per via aerea, con le goccioline di saliva, e da contatto per il controllo dell'infezione sono ancora incerte. Sono stati riportati casi di influenza aviaria da virus H7N7 acquisite in laboratorio e le epidemie in laboratorio di influenza umana da virus H2N2 potrebbero essere anche la causa di un'altra pandemia. Il controllo di questi disastri imminenti richiede una maggiore ricerca in aggiunta ad uno stato d'allerta nazionale ed internazionale a vari livelli. Abbiamo rivisitato l'epidemiologia, la virologia, le caratteristiche cliniche, la diagnosi di laboratorio, il trattamento e le misure ospedaliere di controllo dell'infezione da una prospettiva clinica.

(CHEST Edizione Italiana 2006; 1:61-73)

**Parole chiave:** adamantina; influenza aviaria; H5N1; H7N7; virus influenzale di tipo A; inibitori della neuroaminidasi

**Abbreviazioni:** IC<sub>50</sub> = concentrazione inibente il 50%; OMS = Organizzazione Mondiale della Sanità

### VIRUS INFLUENZALI

L'alto tasso di mutazione, la capacità dei segmenti di genoma di ricombinare e l'enorme numero di virus influenzali negli uccelli e nei mammiferi spiegano il loro comportamento mutevole e la difficoltà di ottenere un vaccino permanente, duraturo ed efficace. I virus influenzali di tipo A, B e C sono i tre generi più importanti di Orthomyxoviridae, un gruppo di virus a RNA a singolo filamento con un genoma segmentato. Gli otto segmenti di RNA del geno-

ma del virus influenzale di tipo A codificano per 11 proteine virali. Queste includono le proteine polimerasi (PB1, PB2, PA, PB1-F2), la proteina del nucleocapside, l'emoagglutinina, la neuraminidasi, le proteine della matrice (M1, M2) e le proteine non strutturali (NS1, NS2). L'emoagglutinina e la neuraminidasi sono i maggiori determinanti antigenici dei virus influenzali di tipo A e servono come base per la classificazione nei loro sottotipi. Ci sono 16 tipi di emoaagglutinina (da H1 a H16) e 9 tipi di neuramini-

dasi (da N1 a N9). L'emoagglutinina media il legame e l'ingresso del virus nelle cellule ospiti attraverso il legame a recettori dell'acido sialico sulla superficie cellulare. L'emoagglutinina rappresenta anche il principale bersaglio virale delle difese immunitarie di tipo umorale da anticorpi neutralizzanti. L'affinità di legame dell'emoagglutinina ai residui di acido sialico rende conto in parte della specificità per l'ospite dei vari sottotipi di virus influenzali di tipo A. I virus dell'influenza umana si legano di preferenza ad acido sialico unito a galattosio mediante un legame  $\alpha$ -2,6 che rappresenta il tipo principale trovato sulle cellule epiteliali del tratto respiratorio nell'uomo, mentre i virus aviari tendono ad unirsi mediante legami  $\alpha$ -2,3 presenti sull'epitelio intestinale delle anatre.<sup>1,2</sup> La specificità per differenti recettori è stata per lungo tempo una delle spiegazioni per la barriera di specie esistente tra i virus dell'influenza aviaria e quelli dell'influenza umana. La presenza di entrambi i legami  $\alpha$ -2,3 e  $\alpha$ -2,6 nell'epitelio tracheale dei maiali è la ragione per la quale i maiali potrebbero rappresentare il "recipiente" per la genesi di nuovi tipi virali tramite la co-infezione.<sup>2</sup> I polli potrebbero avere un ruolo simile in quanto il loro epitelio polmonare e intestinale contiene entrambi i tipi di legame.<sup>3</sup> Nell'epitelio respiratorio umano, è stata dimostrata la presenza di legami  $\alpha$ -2,3 e  $\alpha$ -2,6 rispettivamente nelle cellule ciliate e non ciliate, il che permetterebbe, pertanto, l'infezione nell'uomo da virus dell'influenza aviaria.<sup>4,5</sup> Il cambiamento di un aminoacido della proteina H5 è sufficiente per cambiare la specificità per il recettore dei virus A/H5N1.<sup>6</sup> Pertanto, la barriera all'infezione tra specie può essere superata facilmente.

La neuroaminidasi facilita la diffusione dei virioni nell'ospite fendendo i legami glicosidici all'acido sialico sulle cellule ospiti e la superficie delle particelle virali e costituisce il bersaglio degli inibitori delle neuraminidasi. La notizia di una mutazione nella posizione 274 della neuroaminidasi da istidina a tirosina in un virus A/H5N1 isolato da una ragazza vietnamita è stata associata all'evidenza clinica e laboratoristica di resistenza all'oseltamivir ma non allo zanamivir.<sup>36</sup>

La proteina M2 è un canale ionico cruciale per la

dissociazione pH-dipendente delle proteine matrici dal nucleocapside durante la perdita di rivestimento virale e per le modificazioni di pH attraverso il canale del Golgi durante la maturazione delle molecole di agglutinina. La proteina M2 è il bersaglio delle adamantine (amantadina e rimantadina). La mutazione della proteina M2 da serina ad asparagina al residuo 31 conferisce invariabilmente resistenza alle adamantine ed è stata osservata negli ultimi riscontri di A/H5N1 circolante nel Sud-Est Asiatico a partire dal tardo 2003.<sup>7,8</sup> La proteina PB1-F2 causa l'apoptosi cellulare agendo sui mitocondri dell'ospite.<sup>9</sup> L'emoagglutinina e le proteine PB2 sembrano essere importanti nel determinare la specificità per l'ospite e la virulenza.<sup>10</sup>

L'altra caratteristica importante dei virus influenzali di tipo A è la loro propensione a subire variazioni antigeniche attraverso *drift* antigenico e *shift* antigenico. Il *drift* antigenico rappresenta alterazioni relativamente minori nell'antigenicità dell'emoagglutinina o della neuroaminidasi dovute a mutazione. Questo accade continuamente come risultato della pressione selettiva da parte dell'immunità dell'ospite e spiega il bisogno di cambiamenti annuali nella composizione del vaccino dell'influenza umana. Per esempio, la componente H3N2 del vaccino per l'emisfero Nord per la stagione 2005-2006 è stata cambiata in A/California/7/2004 (H3N3), rispetto a quella A/Fujian/411/2002 (H3N2) usata nella stagione 2004-2005. Lo *shift* antigenico tramite riassortimento genetico degli otto segmenti genici può dare luogo alla comparsa di una nuova combinazione emoagglutinina/neuroaminidasi per la quale la popolazione umana ha scarsa o nessuna immunità. La comparsa di un nuovo tipo antigenico di tal genere potrebbe portare ad una pandemia di influenza nel caso in cui tali tipi possano essere trasmessi efficacemente da uomo a uomo. Le pandemie maggiori sono avvenute nel secolo scorso, nel 1918-1919 (H1N1), nel 1957 (H2N2) e nel 1968 (H3N2). Comunque, è anche possibile che un virus pandemico sia generato dalla semplice mutazione di un virus dell'influenza aviaria, come il tipo A/H5N1, che si adatti all'ospite umano senza riassortimento genetico.

#### EPIDEMIOLOGIA IN CAMBIAMENTO, PATOGENESI IN CAMBIAMENTO

Gli uccelli acquatici sono il serbatoio naturale di tutti i sottotipi del virus dell'influenza di tipo A. Un tempo i virus erano in un equilibrio evolutivistico con questi ospiti volatili, in quanto gli uccelli rimangono asintomatici nonostante l'infezione e il rilascio di un gran numero di virioni. Le infezioni da influenza aviaria nell'uomo avvengono principalmente come risultato di una trasmissione diretta del virus da uccelli infetti all'uomo. Ci sono stati sporadici casi di

\*Da Department of Microbiology, Research Centre of Infection and Immunology, State Key Laboratory of Emerging Infectious Disease, Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong.

Manoscritto ricevuto il 26 ottobre 2005; revisione accettata il 3 novembre 2005.

La riproduzione di questo articolo è vietata in assenza di autorizzazione scritta dell'American College of Chest Physicians ([www.chestjournal.org/misc/reprints.shtml](http://www.chestjournal.org/misc/reprints.shtml)).

Corrispondenza: Kwok-yung Yuen, MD, Department of Microbiology, The University of Hong Kong, University Pathology Building, Queen Mary Hospital, 102 Pokfulam Rd, Hong Kong; e-mail: [hkumicro@hkucc.hku.hk](mailto:hkumicro@hkucc.hku.hk)

(CHEST 2006; 129:156-168)

**Tabella 1—Caratteristiche cliniche dei casi noti di infezione da virus dell'influenza aviaria nell'uomo e delle epidemie\***

Caratteristiche	Stati Uniti, 1980 <sup>12</sup>	Regno Unito, 1995 <sup>13</sup>	Hong Kong, 1997 <sup>15,16</sup>	Hong Kong, 1999 <sup>16</sup>	Hong Kong, 2003 <sup>17</sup>	Olanda, 2003 <sup>18</sup>	Sud-Est asiatico, dal 2003 ad oggi <sup>19†</sup>	Canada, 2004 <sup>20</sup>
Sorgente animale dell'infezione nell'uomo	Foca	Aviaria	Aviaria	Aviaria	Aviaria	Aviaria	Aviaria	Aviaria
Agente eziologico	A/H7N7	A/H7N7	A/H5N1	A/H9N2	A/H5N1	A/H7N7	H5N1	A/H7N3
Casi umani confermati, n	3	1	18	2	2 (importati)	89	133	2
Mortalità, n (tasso di casi fatali, %)	0 (0)	0 (0)	6 (33,3)	0 (0)	1 (50)	1 (1)	68 (51,1)	0 (0)
Sindrome clinica di presentazione	Congiuntivite	Congiuntivite	ILI, polmonite	ILI	ILI, polmonite	Congiuntivite, ILI, polmonite	ILI, polmonite, diarrea, encefalite	Congiuntivite, ILI

\*ILI = sindrome simil-influenzale.

†Fino al 20 ottobre 2005.

infezioni da A/H7N7 nell'uomo per trasmissione diretta animale-uomo o a seguito di incidenti di laboratorio; la maggior parte di queste infezioni ha dato luogo a congiuntiviti (Tabella 1).<sup>11-13,15-20</sup> Tra il 1999 e il 2003, il 3,8% (7 su 185 allevatori di pollame) in Italia avevano evidenza sierologica di infezione da virus dell'influenza aviaria H7 durante un'infezione epizootica da H7N3; solo un allevatore aveva congiuntivite, mentre i rimanenti erano asintomatici.<sup>14</sup>

Il primo segno sinistro che i virus da influenza aviaria potrebbero infettare direttamente l'uomo da specie aviarie su larga scala è avvenuto nel 1997 ad Hong Kong, dando luogo a 18 casi documentati e sei casi fatali.<sup>15,21</sup> L'epidemia è stata controllata con l'abbattimento di 1,5 milioni di polli in allevamenti e mercati di Hong Kong. I virus A/H5N1 sono comparsi nuovamente nel 2001 e 2002 nel pollame senza infezioni nell'uomo.<sup>22</sup> Infezioni umane da virus A/H5N1 sono ricomparse ad Hong Kong nel febbraio 2003 quando una famiglia di cinque elementi era tornata dalla provincia cinese di Fujian. Una ragazza di 7 anni è morta per polmonite da eziologia sconosciuta in Cina. Il padre aveva una polmonite da A/H5N1 virologicamente confermata e ARDS dopo essere tornato ad Hong Kong.<sup>17</sup>

Nel dicembre del 2003 si è verificata nel pollame un'epidemia da infezione da A/H5N1 nella Corea del Sud. Poco dopo Giappone, Thailandia, Laos, Vietnam, Cambogia, Cina, Indonesia e Malesia hanno sperimentato la più grande epidemia da virus A/H5N1 nel pollame della storia. La trasmissione diretta agli uomini si è verificata in 3 ondate, coinvolgendo 133 persone, con 68 morti in Vietnam, Thailandia, Cambogia, Indonesia e Cina.<sup>19</sup> Contemporaneamente, si sono verificate epidemie da virus dell'influenza aviaria meno virulenti nel pollame a Taiwan (A/H5N2) e in Pakistan (A/H7 e A/H9).

La recente epidemia dell'infezione da virus A/H5N1 è degna di nota per due motivi. Per prima cosa, l'estensione geografica dell'epidemia è senza precedenti. Tradizionalmente, la Cina meridionale è considerata l'epicentro sia per il virus dell'influenza nell'uomo che per quello dell'influenza aviaria altamente patogeno. La circolazione di virus dell'influenza aviaria altamente patogeni tra le specie aviarie, i mammiferi domestici e gli allevatori è stata documentata in questa regione.<sup>23</sup> Dal 2004, il virus A/H5N1 ha ampliato i suoi confini verso nord e verso ovest e l'infezione aviaria è stata ora descritta nella Cina occidentale, in Mongolia, Russia, Kazakistan, Mongolia centrale, Turchia e Romania. Questo mette a rischio di infezione una popolazione sempre maggiore. In secondo luogo, sono evidenti cambiamenti genetici dei virus attuali e un cambiamento di ecologia con differenti animali. Dal 2002, gli uccelli acquatici a Hong Kong hanno iniziato a soccombere alle infezioni da A/H5N1. La stessa cosa è stata osservata anche nell'attuale epidemia in Eurasia.

Studi<sup>24,25</sup> su virus A/H5N1 raccolti a partire dal 2003-2004 nel Sudest asiatico hanno dimostrato che questi virus causano infezione non solo nel tratto intestinale ma anche nel tratto respiratorio di anatre, con una carica maggiore a livello della trachea che della cloaca. I virus possono essere rilasciati fino a 17 giorni dopo l'infezione delle anatre (a differenza dei 2-5 giorni negli studi più vecchi). Fatto ancor più importante, hanno mostrato un'aumentata virulenza per i mammiferi, come è stato osservato in studi animali,<sup>10,26-29</sup> e per l'infezione naturale di felini in cattività nelle aree endemiche. Questa maggiore virulenza è stata associata a specifiche modificazioni di aminoacidi nella sequenza della proteina PB2 (come acido aspartico al posto di asparagina nella posizione 701 e acido glutammico al posto di lisina nella posizione 627).<sup>10,29-31</sup> L'infezione disseminata a livello extrapolmonare, compreso il cervello, è stata dimostrata nei topi e nei furetti.<sup>29</sup> Dal 1997 il genotipo Z del virus A/H5N1 è apparso come virus predominante nella Cina meridionale e molti tipi di genotipo Z portano anche mutazioni del gene M2, conferendo, pertanto, resistenza alle adamantine.<sup>7</sup>

Altri virus dell'influenza aviaria sono stati associati anche ad infezioni sintomatiche nell'uomo negli anni recenti (Tabella 1). Infezioni nell'uomo dovute al virus A/H9N2 con manifestazioni influenzali sono state documentate in due pazienti ad Hong Kong nel 1999.<sup>16</sup> L'infezione da H7N3 è stata osservata in due allevatori di pollame in Canada nel 2004.<sup>20</sup> La maggior epidemia di infezione da influenza aviaria non-H5N1 negli uomini si è avuta nel 2003 in Olanda, con 89 casi virologicamente confermati e 1 caso fatale.<sup>18</sup>

Gli uomini sono contagiati dal virus dell'influenza aviaria principalmente attraverso il contatto diretto delle mucose con secrezioni infette ed escrementi di uccelli infetti o con prodotti contaminati provenienti da pollame. Il personale impegnato in operazioni di abbattimento ha contratto l'infezione occasionalmente.<sup>31,32</sup> La principale via d'ingresso sembra essere il tratto respiratorio e la congiuntiva; la seconda sembra essere una via importante per le infezioni da A/H7N7 e A/H7N3. L'introduzione diretta al tratto respiratorio inferiore potrebbe avvenire a seguito di un'esposizione massiva (come durante l'abbattimento), sebbene l'importanza di tale via sia incerta. Il ruolo dell'infezione attraverso il tratto gastrointestinale deve essere ancora stabilito.

Fino ad ora, la trasmissione da uomo a uomo dei virus dell'influenza aviaria è avvenuta sporadicamente con bassissima efficacia. Durante l'epidemia del 1997 ad Hong Kong, un familiare di un paziente con infezione da A/H5N1 senza storia di esposizione a pollame e il 3,7% di operatori sanitari che si erano presi cura di pazienti sono stati successivamente trovati sieropositivi.<sup>33,34</sup> Nella recente epidemia da A/H5N1 nel Sudest asiatico è stata suggerita la pos-

sibilità di trasmissione da uomo a uomo, sebbene due studi<sup>35-38</sup> su operatori sanitari non abbiano dimostrato tale trasmissione. Come per l'infezione da A/H7N7, esiste evidenza che la trasmissione interumana sia avvenuta durante l'epidemia in Olanda nel 2003.<sup>18</sup> Documentate infezioni da A/H7N7 si sono sviluppate in 3 familiari di due pazienti (due casi si sono presentati con congiuntivite e un caso con sindrome simil-influenzale). In sintesi, il cambiamento epidemiologico e patogenetico dei virus dell'influenza aviaria ha preparato il campo per una potenziale epidemia globale particolarmente grave.

## MANIFESTAZIONI CLINICHE E TRATTAMENTO

### *Caratteristiche cliniche e patologia*

Le principali manifestazioni cliniche delle infezioni da influenza aviaria dipendono dal sottotipo virale che causa la malattia. Le infezioni da A/H7N7 danno luogo principalmente a congiuntivite e/o patologia simil-influenzale (Tabella 1).<sup>11-13,31</sup> Nell'epidemia in Olanda del 2003, 82 degli 89 casi (92,1%) si sono manifestati con congiuntivite e i pazienti rimanenti hanno presentato patologia simil-influenzale.<sup>18</sup> Un veterinario ha presentato una sindrome simil-influenzale 2 giorni dopo essersi recato in un allevamento, con progressione a polmonite 7 giorni dopo. La polmonite ha resistito al trattamento e il paziente è morto di ARDS 15 giorni dopo l'esposizione.

Nell'epidemia da A/H5N1 ad Hong Kong nel 1997, una sindrome simil-influenzale è comparsa tipicamente presto nel decorso della malattia e in alcuni pazienti si è osservata congiuntivite.<sup>15,21</sup> L'età dei pazienti andava da 1 a 60 anni (media, 17,2 anni; mediana, 9,5 anni); 11 dei 18 pazienti avevano un'età ≤ 14 anni. Alcuni pazienti hanno avuto prevalentemente sintomi gastrointestinali con addominalgia, diarrea e vomito. Sette dei 18 pazienti sono stati ricoverati a seguito della comparsa di sindrome simil-influenzale; in 11 pazienti la malattia è progredita in polmonite e 6 pazienti sono morti per ARDS o insufficienza multiorgano. Altre complicazioni sono state la sindrome di Reye e l'emorragia polmonare. L'età avanzata, un maggiore periodo sintomatico prima del ricovero, la polmonite, la leucopenia e la linfopenia sono risultati fattori di rischio associati con malattia grave. L'amantadina è stata somministrata a otto pazienti, anche se non è stato possibile dimostrare benefici clinici derivati dal suo utilizzo.

Nel 2004 in un gruppo di 10 pazienti del Vietnam con infezione da A/H5N1, la malattia ha interessato ancora principalmente la popolazione più giovane (età media, 13,7 anni; intervallo, da 5 a 24 anni).<sup>39</sup> Tra i 12 casi confermati in Thailandia, l'età media dei pazienti era di 12 anni (intervallo, da 2 a 58 anni).<sup>40</sup> È stato possibile riscontrare una storia di contatto con pollame dal 58% al 90% dei casi. L'inizio della

malattia è avvenuto in media da 3 a 4 giorni dopo l'esposizione (intervallo, da 2 a 8 giorni).<sup>41</sup> La principale modalità di presentazione è stata la polmonite acquisita in comunità e la febbre era sempre presente. L'intervallo di tempo compreso tra l'insorgenza della malattia e l'ospedalizzazione è stato tra 1 e 8 giorni (mediana, da 3 a 8 giorni).<sup>41</sup> Un sintomo importante è stata la diarrea, presente dal 42% al 70% dei pazienti. Diarrea grave è stata anche il sintomo d'esordio di un bambino di 4 anni in Vietnam, la sorella del quale era morta 2 settimane prima in seguito ad infezione da A/H5N1; entrambi sono morti per infezione disseminata ed encefalite.<sup>42</sup>

Linfopenia e trombocitopenia erano caratteristiche comuni a tutti i gruppi; tali riscontri hanno rappresentato indicatori prognostici per l'ARDS e la morte.<sup>39,40</sup> Tutti i pazienti presentavano anomalie alla radiografia del torace con segni di infiltrazione interstiziale, infiltrazione lobare, consolidazione/collasso e broncogramma aereo. In pazienti sottoposti a ventilazione meccanica è comparso pneumotorace. Il tempo medio di comparsa dell'ARDS è stato di 6 giorni dopo l'inizio della malattia nel gruppo thailandese (intervallo, da 4 a 13 giorni).<sup>40</sup> Il tasso di casi fatali nei due gruppi in Vietnam e Thailandia è stato dal 67% al 80%. L'intervallo di tempo fra la comparsa della malattia e la morte è stato da 4 a 30 giorni (mediana, da 8 a 23 giorni).<sup>41</sup> L'incidenza di infezioni asintomatiche o lievi rispetto ai casi di polmonite non è nota.

Riscontri postmortem in due pazienti a Hong Kong morti per infezione da A/H5N1 dimostravano danno multiorgano, coagulazione intravascolare disseminata, necrosi del tessuto linfoide e atrofia e l'atteso aspetto patologico polmonare da danno diffuso alveolare.<sup>43</sup> La sindrome emofagocitica era l'aspetto predominante. In un altro ragazzo deceduto a seguito di infezione da A/H5N1 in Thailandia, RNA virale è stato ritrovato con la reazione polimerasica a catena nei polmoni, nell'intestino e nella milza, ma la replicazione virale attiva era limitata ai polmoni e all'intestino.<sup>44</sup> Il coinvolgimento intestinale da virus A/H5N1 potrebbe spiegare la frequente presenza di diarrea. La ragione per l'insorgenza di malattia grave ed alta mortalità a seguito di infezione da A/H5N1, maggiori rispetto alle precedenti pandemie di influenza nell'uomo, è sconosciuta. La presenza di un nuovo sottotipo virale verso il quale l'ospite umano non ha una precedente immunità non può spiegare completamente tale fenomeno. La capacità del virus di determinare un'infezione disseminata – comprese viremia ed encefalite – potrebbe essere un fattore importante. Una spiccata attivazione della cascata di citochine proinfiammatorie perpetua la risposta infiammatoria e potrebbe contribuire ad un ulteriore danno tissutale e alla persistenza della sindrome da risposta infiammatoria sistemica.<sup>45</sup>

### *Approccio clinico e diagnosi di laboratorio*

Non esistono segni e sintomi patognomonici dell'infezione da A/H5N1. I reperti clinici, radiologici e di laboratorio non sono distinguibili da altre forme di sindromi simil-influenzali, polmoniti gravi acquisite in comunità o ARDS. L'unico elemento che aumenta il sospetto di influenza aviaria è il legame epidemiologico ad aree endemiche e l'anamnesi di contatto con pollame. I medici di prima linea dovrebbero cercare sempre di ricavare un'anamnesi dettagliata di viaggi ed esposizione ad animali in pazienti sospetti. Quelli con anamnesi positiva per viaggi o contatti dovrebbero essere sottoposti ad indagini radiologiche e microbiologiche appropriate e alle dovute precauzioni per il controllo dell'infezione. I pazienti con lieve sindrome simil-influenzale potrebbero essere isolati e tenuti in stretta osservazione in attesa dell'esito degli esami di laboratorio. Si dovrebbe eseguire una radiografia del torace per escludere il coinvolgimento polmonare. La decisione per l'ospedalizzazione si basa sulla valutazione clinica della gravità della malattia se il paziente può essere seguito prontamente e sulla probabilità di avere un'infezione dal virus dell'influenza aviaria. Quelli con polmonite grave e fattori di rischio per influenza aviaria inizialmente dovrebbero essere trattati empiricamente con oseltamivir e antibiotici ad ampio spettro (ad esempio,  $\beta$ -lattamici in associazione a macrolidi).

La diagnosi definitiva di influenza aviaria viene fatta con un esame culturale positivo su campioni clinici o la dimostrazione di un aumento di quattro volte nel siero del titolo degli anticorpi neutralizzanti l'attuale genotipo circolante dei virus aviari in un laboratorio che garantisca una sicurezza biologica di livello 3. Il siero di convalescenza dovrebbe essere prelevato almeno 14 giorni dall'inizio della sintomatologia. Il test di neutralizzazione anticorpale dovrebbe essere confermato da un test Western blot su baculovirus ricombinante per l'H5.<sup>32</sup> Nessuno di questi test è prontamente disponibile né fornisce risultati rapidi. Ciononostante, dovrebbero essere ordinati in occasione di casi sospetti, poiché potrebbero fornire informazioni cruciali, inclusa la disponibilità di ceppi virali per test di sensibilità antivirale e studi epidemiologici.

La diagnosi rapida attraverso rivelazione antigenica o retrotrascrizione tramite reazione polimerasica a catena per virus influenzali può essere fatta su tampone faringeo o aspirato nasofaringeo messi in materiali che veicolano i virus.<sup>41</sup> Le procedure attraverso aerosol per la raccolta dei campioni dovrebbero essere effettuate con le dovute precauzioni per il controllo dell'infezione. Se possibile, il primo campione dovrebbe essere raccolto prima dell'inizio della terapia antivirale. Gli antigeni virali possono essere rivelati attraverso immunofluorescenza indiretta, saggi immunoenzimatici o saggi immunocromato-

grafici rapidi. Purtroppo, i kit che rivelano la presenza della proteina nucleare dei virus influenzali disponibili in commercio non distinguono né i virus influenzali umani da quelli aviari né i loro sottotipi (A/H5, A/H7 e A/H9). La sensibilità di questi kit per la rivelazione dell'infezione da A/H5N1 varia da 33,5 a 85,7%, in base al piccolo numero dei pazienti studiati.<sup>39,40</sup> I campioni risultati positivi per antigeni influenzali devono essere riconfermati da studi virologici definitivi per la conferma del sottotipo virale.

La retrotrascrizione tramite reazione polimerasica a catena sembra essere il test più promettente per la rivelazione rapida dei virus dell'influenza aviaria. Sono stati descritti vari protocolli per la retrotrascrizione tramite reazione polimerasica a catena per rivelare la presenza di tutti i virus influenzali A o dei geni specifici H5 ed N1.<sup>46-48</sup> Questo test può essere utilizzato in RNA estratti dal plasma, dal liquido cerebrospinale, dai tessuti e dalle feci, oltre che dalle secrezioni delle vie respiratorie. Di nuovo, non esistono raccomandazioni definitive sull'ideale retrotrascrizione mediante reazione polimerasica a catena utilizzando una combinazione di primer o sulla scelta delle indagini di laboratorio e i risultati devono essere confermati da coltura virale.

### Terapie antivirali e aggiuntive

Le adamantine (amantadina e rimantadina) e gli inibitori della neuroaminidasi (oseltamivir e zanamivir) sono maggiormente utilizzati per il trattamento dell'influenza e la chemioprolifassi. Le adamantine sono attive contro i virus influenzali A, mentre gli inibitori della neuroaminidasi sono attivi contro i virus influenzali sia A che B. Attualmente, le adamantine non sono considerate i farmaci di elezione per le infezioni dal virus dell'influenza aviaria per due motivi. Primo, la resistenza alle adamantine emerge rapidamente durante l'uso terapeutico in caso di influenza umana e i virus resistenti sono completamente trasmissibili e patogeni. Fino al 30% dei pazienti con influenza umana A trattati con amantadina potrebbero diffondere virus resistenti, talvolta già nel 2°-3° giorno dopo il trattamento.<sup>49</sup> Tali virus resistenti alle adamantine possono essere prontamente trasmessi ai soggetti a rischio. Secondo, recenti isolamenti di ceppi di A/H5N1 dall'Indocina in Cambogia-Tailandia-Vietnam spesso hanno mutazioni del gene M2; di conseguenza, questo gruppo di agenti antivirali risulta inefficace nel trattamento e nella prevenzione di questa emergente epidemia.<sup>7</sup> Tuttavia, è importante notare che i ceppi isolati in Cina-Indonesia sono ancora abbastanza sensibili all'amantadina. Così, le adamantine dovrebbero ancora essere prese in considerazione per la profilassi nei portatori se il ceppo della pandemia è ancora sensibile. La lunga durata dell'amantadina superiore a 25 anni ed il suo basso costo la rendono una scelta attraente per accumulare riserve.

Non sono stati effettuati studi clinici controllati sull'efficacia degli inibitori della neuroaminidasi per il trattamento e la profilassi delle infezioni umane dal virus dell'influenza aviaria. Data la gravità della malattia, probabilmente non saranno effettuati studi del genere nel futuro prossimo. Pertanto, l'uso degli inibitori della neuroaminidasi nell'ambiente clinico si basa su dati *in vitro* ed esperimenti su animali.

Entrambi gli inibitori della neuroaminidasi sono risultati efficaci in modelli animali nel prevenire la morte e nel migliorare la sopravvivenza che segue l'infezione da virus A/H5N1.<sup>50-52</sup> Come nell'influenza umana, il tempo d'inizio della terapia virale è direttamente correlato alla sopravvivenza degli animali.<sup>50,51</sup> I livelli di protezione più alti si sono visti quando gli inibitori della neuroaminidasi erano somministrati entro 48 ore dall'infezione. L'efficacia della protezione diminuiva sostanzialmente quando gli inibitori della neuroaminidasi erano somministrati più di 60 ore dopo l'infezione. Tuttavia, l'ampiezza di questa finestra di possibilità per l'infezione umana dal virus dell'influenza aviaria non è attualmente nota. Nel 2004 nella serie thailandese, i pazienti sopravvissuti dopo trattamento con oseltamivir sembravano essere stati contagiati prima di quelli che successivamente sono morti (4,5 giorni contro 9 giorni dall'inizio della malattia).<sup>40</sup> I benefici dell'intervento antivirale precoce potrebbero essere annullati dal fatto che i pazienti all'inizio della malattia con sindrome para-influenzale non si rivolgono al medico e che i pazienti di zone distanti o rurali nei paesi in via di sviluppo spesso giungono tardi all'attenzione dei servizi sanitari.

Fino a poco tempo fa, le prove di resistenza agli inibitori della neuroaminidasi avvenuta naturalmente erano poche.<sup>53,54</sup> Entrambi i ceppi A/N1 e A/N2 sono altamente sensibili agli inibitori della neuroaminidasi con una concentrazione inibente 50% (IC<sub>50</sub>) media solitamente inferiore a 5 nmol/L.<sup>53-56</sup> La sensibilità dei virus dell'influenza aviaria agli inibitori della neuroaminidasi è variabile e sembra essere correlata al tipo specifico di neuroaminidasi (Tabella 2). I virus A/H5N1 isolati nel 1997 e nelle recenti epidemie sono prontamente inibiti dai livelli clinicamente rilevabili degli inibitori della neuroaminidasi. Ciononostante, è stato recentemente descritto in Vietnam un ceppo resistente all'oseltamivir.<sup>36</sup> In questa relazione,<sup>36</sup> è stato isolato un virus A/H5N1 resistente all'oseltamivir da una ragazza sintomatica che aveva ricevuto per 4 giorni profilassi con oseltamivir dopo l'esposizione (75 mg x 4/die). Il virus presentava una mutazione di sostituzione della tirosina con istidina alla posizione 274 della proteina della neuroaminidasi e la IC<sub>50</sub> per l'oseltamivir era di 90 nmol/L, entro i livelli plasmatici di oseltamivir clinicamente rilevabili. La ragazza è stata successivamente trattata con dosi terapeutiche di oseltamivir (75 mg x 2/die) per 7 giorni, e dopo il trattamento

**Tabella 2—Caratteristiche chiave degli agenti anti-influenzali disponibili attualmente\***

Caratteristiche	Amantadina <sup>58</sup>	Rimantadina <sup>58</sup>	Oseltamivir†	Zanamivir†	Ribavirina <sup>58,59</sup>
Peso molecolare	187,7	215,8	312,4 (base)	332,3	244,2
Dosaggio usuale per gli adulti e via di somministrazione	Terapeutico e profilattico: 100 mg per os x 2/die; 100 mg per os x 4/die per gli anziani (> 65 anni)	Terapeutico: 100 mg per os x 2/die; 100 mg per os x 4/die per gli anziani (> 65 anni); profilattico: da 50 a 200 mg/die per os	Terapeutico: 75 mg per os x 2/die Profilattico: 75 mg per os x 4/die	Terapeutico: 10 mg per via inalatoria (polvere) x 2/die Profilassi: 10 mg per via inalatoria (polvere) x 4/die (non approvato dalla FDA al momento attuale)	6 g/die per aerosol a 18 h/die; da 600 a 2400 mg/die per os in 3-4 dosi separate; 1,5 mg/kg/h per infusione continua da 2 a 6 giorni.
Emivita, h	12-18	24-36	6-10 (carbossilato, forma attiva del farmaco)	4,14-5,05 (inalazione della polvere); 2 (ev)	24-36 (per via orale)
Biodisponibilità orale, %	86-94	> 90	90	1-5, mediana, 2 (per via orale); 10-20 di assorbimento sistemico dopo inalazione	45
Legame alle proteine, %	59-67	40	3 (carbossilato), 42 (fosfato)	< 10	Nessun legame
Livello di picco plasmatico (dosaggio utilizzato)	300-723 µg/L (100 mg per os x 2/die); 633-1405 µg/L (300 mg/die per os) <sup>60</sup>	140-442 µg/L (100 mg per os x 2/die); 301-913 µg/L (300 mg/die per os) <sup>60</sup>	147-230 µg/L (50 mg per os x 2/die); 308-575 µg/L (100 mg per os x 2/die); 579-897 µg/L (150mg per os x 2/die); 688-1.293 µg/L (200 mg per os x 2/die); 1.363-2.458 µg/L (500 mg per os x 2/die) <sup>62</sup>	39-54 µg/L (10 mg di polvere per inalazione); 340-352,8 µg/L (600 mg ev ogni 12 h) <sup>61</sup> ; 17-142 µg/L (10 mg di polvere per inalazione) <sup>63</sup>	1,3 µg/mL (600 mg per os); 12,5 µg/mL (1.200 mg per os); 3,2 µg/mL (2.400 mg per os); 17 µg/mL (500 mg ev); 24 µg/mL (1.000 mg ev); 0,5-2,2 µg/mL (dopo 8 ore di aerosol); 0,8-3,3 µg/mL (dopo 20 ore di aerosol)
Livello plasmatico al "trough" (dosaggio utilizzato)	350 µg/L (200 mg per os in singola dose) <sup>64</sup>	280 µg/L (200 mg per os in singola dose) <sup>64</sup>	115-137 µg/L (50 mg per os x 2/die); 219-233 µg/L (100 mg per os x 2/die); 468-587 µg/L (200 mg per os x 2/die); 1.101-1.128 µg/L (500 mg per os x 2/die) <sup>62</sup>	441,1-471,1 µg/L (600 mg ev ogni 12 h); concentrazione media dopo inalazione oltre l'intervallo di dosaggio, 40 µg/L <sup>61</sup>	1,25 µg/mL (200 mg per os ogni 8 h); 3,22 µg/mL (400 mg per os ogni 8 h); 4,49 µg/mL (800 mg per os ogni 8 h) <sup>59</sup>
Livello massimo del farmaco nelle secrezioni del tratto respiratorio	Muco nasale; 0,45 µg/g (0,95 volte il livello plasmatico) <sup>64</sup>	Muco nasale; 0,42 µg/g (1,75 volte maggiore del livello plasmatico) <sup>64</sup>	73,6% del livello plasmatico nel liquido broncoalveolare di ratti <sup>65</sup>	Lavaggio nasale: picco, 54,7 µg/L (50 mg ev), 485 µg/L (600 mg ev); 116-184 µg/L <sup>61</sup> ; concentrazione mediana dopo 10 mg per inalazione: 1.336-47 µg/L (6-24 h) nell'epettorato; da 137 µg/L a non dosabile (6-24 h) nel lavaggio nasale <sup>66</sup> ; approssimativamente il 15% della dose inalata depositata nell'albero tracheobronchiale e nel polmone	1000 µg/mL per aerosol <sup>58</sup>
Aggiustamento della dose in caso di insufficienza renale	Si	Si, se la clearance della creatinina è < 10 mL/min	Si	No, se somministrato per inalazione	Si, se la clearance della creatinina è < 50 mL/min
Aggiustamento della dose in caso di insufficienza epatica	No	Si, per disfunzione epatica di grado grave	Nessuna raccomandazione	Nessuna raccomandazione	No

Tabella 2—*Continua\**

Caratteristiche	Amantidina <sup>58</sup>	Rimantidina <sup>58</sup>	Oseltamivir†	Zanamivir†	Ribavirina <sup>58,59</sup>
Metabolismo	Principalmente escreta immodificata con le urine	Ampiamente metabolizzata dal fegato	Ampiamente metabolizzato dal fegato (da fosfato alla forma attiva carbossilato); > 99% del carbossilato escreto con le urine	Metabolismo non significativo	Parzialmente metabolizzata dal fegato
Principale via di eliminazione	Renale	Epatica (<1% del composto progenitore escreto immodificato nelle urine)	Renale (63% del carbossilato escreto nelle urine); < 20% nelle feci	Renale (90% escreto immodificato nelle urine se ev; 16% escreto nelle urine se inalto po)	Renale (40%)
Principali effetti collaterali	Neuropsichiatrici	Simili all'amantadina, ma molto meno frequenti	Pochi effetti collaterali maggiori; ben tollerato fino a 1.000 mg in dose singola o 500 mg x 2/die	Pochi effetti collaterali maggiori; potrebbe causare broncospasmo in pazienti con malattia respiratoria sottostante, come asma e BPCO, anche se non ci sono controindicazioni assolute; ben tollerato fino a 600 mg 2/die ev <sup>61,67</sup>	Anemia, iperbilirubinemia, teratogenicità
Importanti interazioni farmacologiche	Cautela quando si usano altri farmaci neuro- e nefrotossici	Non interazioni farmacologiche clinicamente significative	Non interazioni farmacologiche clinicamente significative	Non interazioni farmacologiche clinicamente significative	Agenti antiretrovirali
IC <sub>50</sub> media di sensibilità per i virus dell'influenza umana A	100-400 µg/L	10-100 µg/L	0,16-0,31 µg/L; 0,19-8.122 µg/L <sup>†70</sup> ; A/N1: 0,09-0,31 µg/L <sup>70</sup> A/N2: 0,06-0,25 µg/L <sup>69</sup>	0,10-1,53 µg/L; 6,65-19.938 µg/L <sup>†69</sup> ; A/N1: 0,17-0,83 µg/L <sup>69</sup> ; A/N2: 0,30-1,86 µg/L <sup>69</sup>	2,6-6,8 µg/L <sup>68</sup>
IC <sub>50</sub> media per i virus dell'influenza aviaria A (anno dei ceppi isolati)	A/H5N1 (2003-2004): > 8.000 µg/L <sup>71</sup> A/H5N1 (2003): > 18.770 µg/L <sup>72</sup> A/H5N3 (2003): 18,77 µg/L <sup>72</sup> A/H7N2 (2002): 18,77 µg/L <sup>86</sup> A/H7N2 (2003): 6231,64-8277,57 µg/L <sup>72</sup> A/H9N2 (2000): > 18.770 µg/L <sup>72</sup> A/H9N2 (2001): 91,97 µg/L <sup>72</sup>		A/H5N1 (1997): 2,19 µg/L, 2343 µg/L <sup>†50</sup> A/H5N1 (2003-2004): 0,78-3,09 µg/L (mediana) <sup>8</sup> A/H5N1 (2004): 0,12 µg/L, 31,24 µg/L <sup>†58</sup> A/H5N1 (2005): 28,11 µg/L, uno dei cloni > 238,56 µg/L <sup>36</sup> A/H7N7 (2003): 0,40 µg/L <sup>18</sup> A/H9N2 (1997-1999): 3,12-4,69 µg/L, 3,12-3,75 µg/L <sup>†50</sup> A/N1 a N9 (1949-1997): 0,59-21,62 µg/L, 312,40-13.120,80 µg/L <sup>†75</sup>	A/H5N1 (1997): 1,67 µg/L, 3.323 µg/L <sup>†52</sup> A/H5N1 (2004): 0,27 µg/L, 299,07 µg/L <sup>†71</sup> A/H5N1 (2005): 0,17-1,03 µg/L <sup>36</sup> A/H6N1 (1997): 2,49 µg/L, 2,82 µg/L <sup>†52</sup> A/H7N7 (2003): 1,31 µg/L <sup>18</sup> A/H9N2 (1997): 2,33-3,32 µg/L, 3,32-4,65 µg/L <sup>†52</sup> A/N1 a N9 (1949-1997): 0,73-10,00 µg/L, <sup>1</sup> 1.329,20-19.373,09 µg/L <sup>†9</sup>	A/H5N1 (1981): 2,3 µg/mL, 1,6 µg/mL <sup>†73</sup> A/H5N1 (1983): 4,3 µg/mL, 1,2 µg/mL <sup>†73</sup>

\*FDA = Food and Drug Administration degli Stati Uniti.

†L'attività antivirale degli inibitori della neuroaminidasi come indicata dai valori dell'IC<sub>50</sub> è determinata sia dall'inibizione dell'attività enzimatica della neuroaminidasi che dall'inibizione delle colture cellulari su piastra (espressa anche come EC<sub>50</sub>). Le metodiche più recenti tendenzialmente danno risultati più variabili e livelli di IC<sub>50</sub> più alti. La sensibilità *in vivo* dei virus influenzali a questo gruppo di composti è più vicina ai risultati dei saggi dell'inibizione della NA.<sup>76</sup> I valori per l'IC<sub>50</sub> sono determinati dall'inibizione enzimatica della neuroaminidasi se non altrimenti specificato. L'EC<sub>50</sub> è determinata da riduzione della carica virale su colture cellulari o analisi di micro-centralizzazione.

non sono stati isolati dei virus. Questo livello di resistenza apparentemente non ha portato a fallimento terapeutico in questo caso; tuttavia, non è possibile tirare le conclusioni definitive basandosi su un singolo caso riportato. Uno dei cloni virali isolati aveva, tuttavia, una  $IC_{50}$  per l'oseltamivir  $> 763$  nmol/L. L'ampio uso di oseltamivir nel trattamento dell'influenza umana nei bambini è stato associato ad un rischio considerevole di sviluppo di resistenza al prodotto.<sup>57</sup> Pertanto, non sarà sorprendente vedere più virus A/H5N1 resistenti all'oseltamivir con l'aumento del numero dei casi umani e l'utilizzo sempre più comune di questo farmaco a scopo profilattico o terapeutico. Sono urgentemente necessarie altre strategie per la terapia e la profilassi antivirale.

L'associazione di oseltamivir e rimantadina aveva un'azione sinergica nel prevenire la mortalità da infezioni da A/H9N2 in studi animali, anche se non sono stati realizzati studi animali o *in vitro* su altri virus dell'influenza aviaria.<sup>50,51</sup> Inoltre, l'aumentata virulenza di ceppi di virus A/H5N1 recentemente isolati sembra ridurre l'efficacia degli inibitori della neuroaminidasi in modelli animali.<sup>74</sup> Un'aumentata dose quotidiana (10 mg/kg/die contro 1 mg/kg/die in topi) ed una durata del trattamento prolungata (8 giorni contro 5 giorni) con oseltamivir migliora in modo significativo la sopravvivenza negli animali. I dati di questo studio meritano di essere valutati negli uomini per determinare la dose ottimale di oseltamivir per l'influenza aviaria, la quale, probabilmente, necessita di dosi più elevate di quelle attualmente raccomandate per l'influenza umana. L'aumento della dose è indicato soprattutto in pazienti con alta carica virale dovuta ad un ritardo di presentazione dei sintomi, malattia grave con shock o scarso assorbimento dei farmaci somministrati per os per diarrea grave. Nonostante la somministrazione di alte dosi di oseltamivir in soggetti sani volontari a dosaggi superiori a quelli terapeutici non abbia provocato effetti collaterali significativi,<sup>77</sup> qualsiasi potenziale tossicità associata a regimi ad alte dosi dovrà essere strettamente monitorata negli studi clinici terapeutici.

Se l'uso di un'aumentata dose degli inibitori della neuroaminidasi per le infezioni dell'influenza aviaria recasse effetti benefici, ci sarebbe un impatto importante sulla fornitura di questi agenti in caso di pandemia. Un'opzione è quella di utilizzare l'associazione di oseltamivir e probenecid per raddoppiare l'esposizione sistemica a seguito di un dosaggio convenzionale di oseltamivir.<sup>78</sup> Un'altra opzione è quella di utilizzare un'associazione di due inibitori della neuroaminidasi o un inibitore della neuroaminidasi con un'amantadina se il genotipo circolante è sensibile alle adamantine oppure un inibitore della neuroaminidasi con la ribavirina (o viramidina quando disponibile). Gli effetti sinergici di queste associazioni, se esistono, andrebbero studiati urgente-

mente con studi *in vitro* e in animali. La ribavirina è stata usata nel trattamento dell'infezione dal virus dell'influenza umana A, di solito somministrata per os o tramite aerosol e occasionalmente per via endovenosa in caso di infezione grave o di soggetti immunocompromessi. Negli studi clinici non è stato visto un beneficio consistente e, attualmente, la ribavirina non è considerata un farmaco d'elezione per l'infezione dall'influenza A. I dati esistenti sull'attività della ribavirina sui virus dell'influenza aviaria si limitano a studi *in vitro*.<sup>73</sup> Tuttavia, la ribavirina è stata altamente efficace nel ridurre la mortalità in un modello di topi infettati da influenza B, anche quando il trattamento era posticipato di 3 giorni dopo l'infezione, quando il trattamento con oseltamivir non era più efficace. In questo modello animale, il trattamento a base di oseltamivir e ribavirina con inizio ritardato non ne aumenta l'efficacia. La viramidina è una carboxamidina analoga della ribavirina che mostra attività antivirali ad ampio spettro come la ribavirina. La sua attività antiinfluenzale è stata confermata in limitati studi *in vitro* e in animali.<sup>73</sup> L'utilizzo clinico della viramidina non è attualmente autorizzato.

L'accumulo di riserve di inibitori della neuroaminidasi rappresenta un elemento essenziale del piano globale contro la pandemia influenzale.<sup>79</sup> Nonostante l'efficacia sovrapponibile degli inibitori della neuroaminidasi nella terapia dell'influenza umana, la maggior parte dei piani nazionali per la pandemia e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) raccomandano preferenzialmente l'oseltamivir, probabilmente per i livelli sierici relativamente più bassi dello zanamivir e la carenza di dati relativi al trattamento con zanamivir nell'influenza da H5N1 negli uomini.<sup>80,81</sup> L'oseltamivir viene somministrato per os, mentre lo zanamivir attraverso polvere inalatoria. La modalità di somministrazione dello zanamivir potrebbe essere problematica in alcuni tipi di popolazione, per esempio pazienti molto giovani o molto anziani, gli intubati e quelli con malattia grave che non riescono ad inalare la polvere correttamente. L'oseltamivir è più facile da somministrare e in teoria più efficace in caso di malattia sistemica o polmonite grave (con collasso e/o consolidazione polmonare che impedirebbe la penetrazione dello zanamivir inalato). Tuttavia, entrambi gli inibitori della neuroaminidasi dovrebbero essere a disposizione, in quanto la resistenza crociata tra i due è incompleta. Per esempio, il ceppo A/H5N1 resistente all'oseltamivir isolato in Vietnam e descritto precedentemente rimane completamente sensibile allo zanamivir. Un accumulo soddisfacente di zanamivir non soltanto mitiga la pressione sulle riserve di oseltamivir ma potrebbe essere necessario quando nel futuro i virus resistenti all'oseltamivir diventeranno prevalenti. Lo zanamivir dovrebbe essere preso in considerazione per la profilassi del personale sanitario che si occupa

di pazienti in trattamento con oseltamivir per influenza aviaria. Lo zanamivir potrebbe essere utilizzato per la profilassi o il trattamento di pazienti meno gravi, in quanto non sarebbero necessari alti livelli ematici di farmaco (i livelli ematici dello zanamivir sono quasi 5 volte inferiori all'oseltamivir). Tuttavia, l'oseltamivir potrebbe essere riservato per pazienti con infezione sistemica o polmonite grave che necessitano di livelli ematici elevati. Sfortunatamente non esistono in commercio né altre formulazioni di zanamivir né l'agente più nuovo peramivir. In studi preclinici, lo zanamivir somministrato endovena anche a dosaggi fino a 1.200 mg/die è stato molto ben tollerato e raggiunge alti livelli nel sangue e nelle secrezioni respiratorie; è stata inoltre dimostrata l'efficacia protettiva in infezioni umane sperimentali.<sup>61,67</sup> Il ruolo dell'associazione degli inibitori della neuroaminidasi è dubbio, come anche l'associazione con altre categorie di antivirali. Tuttavia, un basso livello sierico di zanamivir in pazienti con consolidazione polmonare potrebbe in teoria promuovere l'insorgenza di virus resistenti allo zanamivir che hanno anche una resistenza all'oseltamivir.

Per il trattamento delle polmoniti virali sono stati utilizzati immunomodulanti come corticosteroidi e Ig endovena.<sup>82</sup> I corticosteroidi erano stati utilizzati per un piccolo numero di pazienti con polmonite da A/H5N1, spesso complicata da iperglicemia, ad Hong Kong, in Vietnam e in Thailandia. I pazienti che hanno assunto corticosteroidi nelle tre epidemie erano 3 (2 morti), 7 (6 morti) e 8 (6 morti), rispettivamente.<sup>39,40,83</sup> Nonostante una cascata di citochine sia stata incriminata come il possibile meccanismo patogenetico della polmonite da A/H5N1, le prove attuali non supportano un ruolo benefico dei corticosteroidi o di altri immunomodulanti nella gestione delle infezioni gravi da A/H5N1.<sup>41</sup>

### *Controllo dell'infezione tramite misure sanitarie*

L'epidemia della sindrome respiratoria acuta grave dalla fine del 2002 alla metà del 2003 ha messo in evidenza la vulnerabilità del personale sanitario alla trasmissione nosocomiale delle malattie infettive.<sup>83</sup> Inoltre, questi focolai ospedalieri potrebbero rappresentare la fonte di successive epidemie su larga scala in comunità.<sup>84</sup> Quindi, il controllo delle infezioni ospedaliere è un elemento cruciale nella gestione delle malattie infettive emergenti. Per i pazienti sospetti o affetti da influenza aviaria confermata, l'OMS ha consigliato delle precauzioni per la trasmissione da contatto e attraverso goccioline di saliva come misure-chiave.<sup>85</sup> Sono, inoltre, consigliate precauzioni per la trasmissione aerogena, date la mortalità elevata e la capacità dei virus dell'influenza umana di essere trasmessi da goccioline di saliva. L'importanza relativa di queste vie di trasmissione è, attualmente, dubbia. L'interessamento gastrointesti-

nale dai virus A/H5N1 con cospicua diarrea e alta carica virale a livello fecale in alcuni pazienti non dovrebbe essere trascurato. Una combinazione simile di reperti clinico-patologici durante l'epidemia di SARS ad Hong Kong ha portato ad un'epidemia senza precedenti in un quartiere attraverso trasmissione aerogena di un aerosol di piume carico di virus proveniente da un difettoso sistema fognario.<sup>84</sup> Oltre alle infezioni acquisite in ospedale, sono state segnalate anche infezioni acquisite in laboratorio durante le indagini post-mortem in foche infette da A/H7N2. Nel 1977 si pensava che il ceppo A/H1N1 provenisse da un laboratorio in Russia. Nel 2005 un ceppo del virus A/H2N2 è stato inviato per errore nei laboratori di 18 paesi nell'ambito di un programma di controllo di competenza. Pertanto, anche le difettose precauzioni nel laboratorio possono rappresentare una fonte di pandemia. I virus dell'influenza aviaria vengono prontamente inattivati dai comuni disinfettanti e l'OMS raccomanda attualmente per la disinfezione l'uso di ipoclorito di sodio all'1% o di alcool al 70%.<sup>85-87</sup>

### MISURE PREVENTIVE

Il controllo dell'influenza aviaria altamente patogena negli animali è un compito gigantesco che è stato recentemente affrontato.<sup>88</sup> Sono essenziali per il controllo della diffusione intercontinentale dell'influenza aviaria delle strette regole e il controllo degli uccelli e del pollame in commercio (sia da importazioni legali che di contrabbando). Un'adeguata manipolazione del pollame, l'igiene personale (per esempio lavarsi le mani) e il minimo contatto con gli uccelli costituiscono le precauzioni basali che vanno rinforzate. In alcune occasioni, l'utilizzo del vaccino H5 nel pollame è stato in grado di interrompere la trasmissione del virus nel campo.<sup>89</sup> Attualmente, non esistono vaccini per l'influenza H5 autorizzati per essere utilizzati negli uomini, ma questo progetto è in corso. Precedentemente è stato testato in soggetti umani un vaccino dell'H5N3 inattivato che è stato ben tollerato.<sup>90</sup> Un vaccino con l'aggiunta di MF59 era immunogenico in soggetti volontari con sviluppo di anticorpi neutralizzanti anti-A/H5N1.<sup>91</sup> Un altro vaccino ottenuto dal baculovirus ricombinante che esprime l'emoagglutinina dell'H5 è stato ulteriormente testato in soggetti umani ed era immunogenico.<sup>92</sup> Altri vaccini candidati che sembravano protettivi in modelli animali comprendono un vaccino contro l'A/H5N1 nato attraverso genetica inversa.<sup>93</sup> Anche se lo sviluppo di vaccini sta crescendo, non bisogna dimenticare che il ceppo della pandemia potrebbe avere delle differenze antigeniche significative dai vaccini per l'H5N1 che si stanno sviluppando. Se questo dovesse accadere, dovrebbe essere sviluppato un nuovo vaccino almeno 6

mesi prima che sia disponibile in commercio un vaccino efficace per la vaccinazione di massa.

In assenza di un vaccino efficace per gli uomini, la chemioprolifassi antivirale rimane l'unico mezzo attuabile per la protezione specifica contro l'influenza aviaria. La profilassi con oseltamivir è stata utilizzata in Olanda durante l'epidemia da A/H7N7 per individui ad alto rischio, come il personale coinvolto nell'operazione di eliminazione degli animali malati negli allevamenti e il personale sanitario e i familiari di pazienti affetti da polmonite da A/H7N7. Le persone sottoposte a profilassi con oseltamivir avevano un rischio inferiore per l'infezione da influenza aviaria (il tasso di infezione era del 2,6% contro il 9,6% in quelli con e senza profilassi, rispettivamente), anche se la differenza non era statisticamente significativa.<sup>18</sup>

#### PROSPETTIVE

L'influenza aviaria sembra essere il candidato più probabile per la prossima pandemia influenzale. I vaccini sono, probabilmente, i mezzi più efficaci per la protezione specifica, ma la capacità di produrre vaccini tempestivamente limiterà il loro ruolo nella prima fase della pandemia. L'uso indiscriminato degli inibitori della neuroaminidasi per l'infezione dal virus dell'influenza umana dovrebbe essere scoraggiato poiché questo favorirà l'insorgenza di virus influenzali resistenti agli inibitori della neuroaminidasi.<sup>57</sup> Un altro potenziale interesse è il riassortimento tra virus A/H1N1 o A/H3N2 resistenti agli inibitori della neuroaminidasi con virus A/H5N1 che porta ad A/H5N1 resistenti agli inibitori della neuroaminidasi con aumentata trasmissibilità uomo-uomo. Servono urgentemente degli studi che includano il ruolo delle associazioni di terapie antivirali nel trattamento delle infezioni gravi e la capacità di prevenire l'insorgenza di ceppi virali resistenti. Dovrebbe essere indagata l'efficacia di altri agenti, come la ribavirina (attraverso aerosol o somministrazione sistemica) sia da sola che in associazione. Durante un'epidemia vanno eseguiti test di sensibilità antivirale su nuovi ceppi, dal momento che non tutti i virus A/H5N1 sono resistenti alle adamantine (dati non pubblicati, 2001). Mentre l'oseltamivir è tossico nei topi neonati ad una dose di 250 volte superiore a quella raccomandata in pediatria, l'uso di oseltamivir in bambini con meno di un anno di vita non ha dato problemi di neurotossicità. Questo andrebbe confermato da ampi studi clinici.<sup>94,95</sup> I tentativi per prevenire o minimizzare l'impatto dell'incombente pandemia non dovrebbero basarsi soltanto sulle misure terapeutiche. Il controllo delle semplici infezioni acquisite in comunità e le misure igieniche personali sono importanti per le infezioni respiratorie, come dimostrato nell'epidemia dalla sindrome

respiratoria acuta grave nel 2003.<sup>96</sup> L'infezione umana dal virus dell'influenza aviaria è attualmente limitata a persone con contatti stretti con animali ammalati. Per i viaggiatori in aree endemiche per l'influenza aviaria, evitare i contatti ravvicinati con polli o uccelli selvatici potrebbe ridurre significativamente il rischio di infezione.

RINGRAZIAMENTI: Vorremmo esprimere la nostra gratitudine ai Professori YH Yu e NK Leung per il loro infallibile sostegno nella ricerca e le malattie infettive ad Hong Kong.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1 Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium: the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res* 1993; 29:155-165
- 2 Ito T, Couceiro JN, Kelm S, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 1998; 72:7367-7373
- 3 Gambaryan AS, Tuzikov AB, Bovin NV, et al. Differences between influenza virus receptors on target cells of duck and chicken and receptor specificity of the 1997 H5N1 chicken and human influenza viruses from Hong Kong. *Avian Dis* 2003; 47(3 Suppl):1154-1160
- 4 Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, et al. Human and avian influenza (AI) viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:4620-4624
- 5 Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, et al. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol* 1999; 73:1146-1155
- 6 Gambaryan A, Tuzikov A, Pazynina G, et al. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology* 2005 (in press)
- 7 Li KS, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 2004; 430:209-213
- 8 The World Health Organization Global Influenza Program Surveillance Network. Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1515-1521
- 9 Chanturiya AN, Basanez G, Schubert U, et al. PB1-F2, an influenza A virus-encoded proapoptotic mitochondrial protein, creates variably sized pores in planar lipid membranes. *J Virol* 2004; 78:6304-6312
- 10 Li Z, Chen H, Jiao P, et al. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol* 2005; 79:12058-12064
- 11 Taylor HR, Turner AJ. A case report of fowl plague keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 1977; 61:86-88
- 12 Webster RG, Geraci J, Petrusson G, et al. Conjunctivitis in human beings caused by influenza A virus of seals. *N Engl J Med* 1981; 304:911
- 13 Kurtz J, Manvell RJ, Banks J. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. *Lancet* 1996; 348:901-902
- 14 Puzelli S, di Trani L, Fabiani C, et al. Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. *J Infect Dis* 2005; 192:1318-1322
- 15 Yuen KY, Chan PKS, Peiris M, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 1998; 351:467-471
- 16 Peiris M, Yuen KY, Leung CW, et al. Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 1999; 354:916-917

- 17 Peiris JS, Yu WC, Leung CW, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet* 2004; 363:617–619
- 18 Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet* 2004; 363:587–593
- 19 World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 29 November, 2005. Available at: [www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/cases\\_table\\_2005\\_11\\_29/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2005_11_29/en/index.html). Accessed December 1, 2005
- 20 Tweed SA, Skowronski DM, David ST, et al. Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:2196–2199
- 21 Chan PKS. Outbreak of avian influenza A (H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis* 2002; 34(suppl 2):S58–S64
- 22 Sims LD, Ellis TM, Liu KK, et al. Avian influenza in Hong Kong 1997–2002. *Avian Dis* 2003; 47(3 Suppl):832–838
- 23 Shortridge KF. Avian influenza A viruses of southern China and Hong Kong: ecological aspects and implications for man. *Bull World Health Organ* 1982; 60:129–135
- 24 Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Humbert J, et al. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:10682–10687
- 25 Sturm-Ramirez KM, Hulse-Post DJ, Govorkova EA, et al. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia? *J Virol* 2005; 79:11269–11279
- 26 Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, et al. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:699–701
- 27 Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T, et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:2189–2191
- 28 Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D, et al. Avian H5N1 influenza in cats. *Science* 2004; 306:241
- 29 Maines TR, Lu XH, Erb SM, et al. Avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. *J Virol* 2005; 79:11788–11800
- 30 Govorkova EA, Reh JE, Krauss S, et al. Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. *J Virol* 2005; 79:2191–2198
- 31 Amonsin A, Payungporn S, Theamboonlers A, et al. Genetic characterization of H5N1 influenza A viruses isolated from zoo tigers in Thailand. *Virology* 2005 (in press)
- 32 Bridges CB, Lim W, Primmer JH, et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997–1998. *J Infect Dis* 2002; 185:1005–1010
- 33 Katz JM, Lim W, Bridges CB, et al. Antibody response in individuals infected with avian influenza A (H5N1) viruses and detection of anti-H5 antibody among household and social contacts. *J Infect Dis* 1999; 180:1763–1770
- 34 Bridges CB, Katz JM, Seto WH, et al. Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong. *J Infect Dis* 2000; 181:344–348
- 35 Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, et al. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med* 2005; 352:333–340
- 36 Le QM, Kiso M, Someya K, et al. Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* 2005; 437:1108
- 37 Liem NT, Lim W. World Health Organization International Avian Influenza Investigation Team, Vietnam. Lack of H5N1 avian influenza transmission to hospital employees, Hanoi, 2004. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:210–215
- 38 Schultz C, Dong VC, Chau NVV, et al. Avian influenza H5N1 and healthcare workers. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1158–1159
- 39 Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* 2004; 350:1179–1188
- 40 Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, et al. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:201–209
- 41 The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med* 2005; 353:1374–1385
- 42 de Jong MD, Bach VC, Phan TQ, et al. Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl J Med* 2005; 352:686–691
- 43 To KF, Chan PKS, Chan KF, et al. Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J Med Virol* 2001; 63:242–246
- 44 Uiprasertkul M, Puthavathana P, Sangsriwut K, et al. Influenza A H5N1 replication sites in humans. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1036–1041
- 45 Cheung CY, Poon LLM, Lau AS, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* 2002; 360:1831–1837
- 46 Spackman E, Senne DA, Myers TJ, et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3256–3260
- 47 Lee CW, Suarez DL. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. *J Virol Methods* 2004; 119:151–158
- 48 Payungporn S, Phakdeewit P, Chutinimitkul S, et al. Single-step multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for influenza A virus subtype H5N1 detection. *Viral Immunol* 2004; 17:588–593
- 49 Hayden FG, Hay AJ. Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 176:119–130
- 50 Leneva IA, Roberts N, Govorkova EA, et al. The neuraminidase inhibitor GS4104 (oseltamivir phosphate) is efficacious against A/Hong Kong/156/97 (H5N1) and A/Hong Kong/1074/99 (H9N2) influenza viruses. *Antiviral Res* 2000; 48:101–115
- 51 Govorkova EA, Fang HB, Tan M, et al. Neuraminidase inhibitor-rimantadine combinations exert additive and synergistic anti-influenza virus effects in MDCK cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4855–4863
- 52 Leneva IA, Golubeva O, Fenton RJ, et al. Efficacy of zanamivir against avian influenza A viruses that possess genes encoding H5N1 internal proteins and are pathogenic in mammals. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1216–1224
- 53 Ferraris O, Kessler N, Lina B. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: a study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Res* 2005; 68:43–48
- 54 McKimm-Breschkin J, Trivedi T, Hampson A, et al. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2264–2272
- 55 Hurt AC, Barr IG, Hartel G, et al. Susceptibility of human influenza viruses from Australasia and South East Asia to the neuraminidase inhibitors zanamivir and oseltamivir. *Antiviral Res* 2004; 62:37–45
- 56 Boivin G, Goyette N. Susceptibility of recent Canadian influenza A and B viruses isolates to different neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res* 2002; 54:143–147
- 57 Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 2004; 364:759–765

- 58 Inouye RT, Panther LA, Hay CM, et al. Antiviral agents. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical virology*. 2nd ed. Washington DC: ASM Press, 2002; 171–242
- 59 Whitley RJ. Other antiviral agents. In: Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, et al, eds. *Antibiotic and chemotherapy*. 8th ed. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone, 2003; 494–509
- 60 Hayden FG, Hoffman HE, Spyker DA. Differences in side effects of amantadine hydrochloride and rimantadine hydrochloride relate to differences in pharmacokinetics. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23:458–464
- 61 Cass LM, Efthymiopoulos C, Bye A. Pharmacokinetics of zanamivir after intravenous, oral, inhaled or intranasal administration to healthy volunteers. *Clin Pharmacokinet* 1999; 36(Suppl1):1–11
- 62 Massarella JW, He GZ, Dorr A, et al. The pharmacokinetics and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir (Ro 64-0796/GS4104) in healthy adult and elderly volunteers. *J Clin Pharmacol* 2000; 40:836–843
- 63 GlaxoSmithKline. Relenza, prescribing information. Available at: [http://us.gsk.com/products/assets/us\\_relenza.pdf](http://us.gsk.com/products/assets/us_relenza.pdf). Accessed December 20, 2005
- 64 Hayden FG, Minocha A, Spyker DA, et al. Comparative single-dose pharmacokinetics of amantadine hydrochloride and rimantadine hydrochloride in young and elderly adults. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:216–221
- 65 Eisenberg EJ, Bidgood A, Cundy KC. Penetration of GS4071, a novel influenza neuraminidase inhibitor, into rat bronchoalveolar lining fluid following oral administration of the prodrug GS4104. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1949–1952
- 66 Peng AW, Milleri S, Stein DS. Direct measurement of the anti-influenza agent zanamivir in the respiratory tract following inhalation. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1974–1976
- 67 Calfee DP, Peng AW, Cass LM, et al. Safety and efficacy of intravenous zanamivir in preventing experimental human influenza A virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1616–1620
- 68 Hayden FG, Cote KM, Douglas RG Jr. Plaque inhibition assay for drug susceptibility testing of influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17:865–870
- 69 Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 2000; 355:827–835
- 70 McClellan K, Perry CM. Oseltamivir: a review of its use in influenza. *Drugs* 2001; 61:263–283
- 71 Puthavathana P, Auewarakul P, Charoenying PC, et al. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol* 2005; 86:423–433
- 72 Ilyushina NA, Govorkova EA, Webster RG. Detection of amantadine-resistant variants among avian influenza viruses isolated in North America and Asia. *Virology* 2005; 341:102–106
- 73 Sidwell RW, Bailey KW, Wong MH, et al. *In vitro* and *in vivo* influenza virus-inhibitory effects of rimantadine. *Antiviral Res* 2005; 68:10–17
- 74 Yen HL, Monto AS, Webster RG, et al. Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice. *J Infect Dis* 2005; 192:665–672
- 75 Govorkova EA, Leneva IA, Golubeva OG, et al. Comparison of efficacies of RWJ-270201, zanamivir, and oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2723–2732
- 76 Barnett JM, Cadman A, Gor D, et al. Zanamivir susceptibility monitoring and characterization of influenza virus clinical isolates obtained during phase II clinical efficacy studies. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:78–87
- 77 Massarella JW, He GZ, Dorr A, et al. The pharmacokinetics and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir (Ro 64-0796/GS4104) in healthy adult and elderly volunteers. *J Clin Pharmacol* 2000; 40:836–843
- 78 Hill G, Cihlar T, Oo C, et al. The anti-influenza drug oseltamivir exhibits low potential to induce pharmacokinetic drug interactions via renal secretion: correlation of *in vivo* and *in vitro* studies. *Drug Metab Dispos* 2002; 30:13–19
- 79 World Health Organization. Responding to the avian influenza pandemic threat: recommended strategic actions. Available at: [www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\\_CDS\\_CSR\\_GIP\\_05\\_8-EN.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_05_8-EN.pdf). Accessed December 20, 2005
- 80 Butler D. WHO urges regional offices to stockpile flu drug for staff. *Nature* 2005; 436:899
- 81 Coombes R. UK stocks up on antiviral drug to tackle flu outbreak. *BMJ* 2005; 330:495
- 82 Cheng VC, Tang BS, Wu AK, et al. Medical treatment of viral pneumonia including SARS in immunocompetent adult. *J Infect* 2004; 49:262–273
- 83 World Health Organization. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. Available at: [www.who.int/csr/sars/country/table2004\\_04\\_21/en/index.html](http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html). Accessed December 20, 2005
- 84 Yu IT, Li Y, Wong TW, et al. Evidence of airborne transmission of the severe acute respiratory syndrome virus. *N Engl J Med* 2004; 350:1731–1739
- 85 World Health Organization. Influenza A (H5N1): WHO interim infection control guidelines for health care facilities. Available at: [www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/infectioncontrol1/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/infectioncontrol1/en/). Accessed December 20, 2005
- 86 Suarez DL, Spackman E, Senne DA, et al. The effect of various disinfectants on detection of avian influenza virus by real time RT-PCR. *Avian Dis* 2003; 47(3 Suppl):1091–1095
- 87 Davison S, Benson CE, Ziegler AF, et al. Evaluation of disinfectants with the addition of antifreezing compounds against nonpathogenic H7N2 avian influenza virus. *Avian Dis* 1999; 43:533–537
- 88 The Food and Agriculture Organization of the United Nations. A global strategy for the progressive control of highly pathogenic avian influenza (HPAI). Available at: [www.fao.org/ag/againfo/resources/documents/empres/AI\\_globalstrategy.pdf](http://www.fao.org/ag/againfo/resources/documents/empres/AI_globalstrategy.pdf). Accessed December 20, 2005
- 89 Ellis TM, Leung CY, Chow MK, et al. Vaccination of chickens against H5N1 avian influenza in the face of an outbreak interrupts virus transmission. *Avian Pathol* 2004; 33:405–412
- 90 Nicholson KG, Colegate AC, Podda A, et al. Safety and antigenicity of nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet* 2001; 357:1937–1943
- 91 Stephenson I, Bugarini R, Nicholson KG, et al. Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a potential priming strategy. *J Infect Dis* 2005; 191:1210–1215
- 92 Treanor JJ, Wilkinson BE, Masseoud F, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine* 2001; 19:1732–1737
- 93 Lipatov AS, Webby RJ, Govorkova EA, et al. Efficacy of H5 influenza vaccines produced by reverse genetics in a lethal mouse model. *J Infect Dis* 2005; 191:1216–1220
- 94 Okamoto S, Kamiya I, Kishida K, et al. Experience with oseltamivir for infants younger than 1 year old in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24:575–576
- 95 Tamura D, Miura T, Kikuchi Y. Oseltamivir phosphate in infants under 1 year of age with influenza infection. *Pediatr Int* 2005; 47:484
- 96 Lo JYC, Tsang THF, Leung YH, et al. Respiratory Infections during SARS Outbreak, Hong Kong, 2003. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1738–1741