

Analisis evolusi dan imunogenisitas gen NA dari virus H3N2 endemik Indonesia tahun 2005-2018 secara *in silico*

Sari Mariyati Dewi Nataprawira^{1,*}, Erick Sidarta¹, Triyana Sari²

¹ Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jakarta, Indonesia

² Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jakarta, Indonesia

*korespondensi email: sarid@gmail.com

ABSTRAK

Influenza merupakan penyakit yang masih menjadi perhatian pemerintah terutama Indonesia karena dapat menyebabkan endemik sepanjang tahun dan dapat menimbulkan dampak yang berat bagi penderitanya. Virus Influenza A/H3N2 merupakan virus penyebab yang dominan di Indonesia. Pada permukaan virus terdapat protein yang berperan pada proses fusi virus ke sel pejamu, salah satunya adalah neuraminidase. Protein ini berperan untuk memotong *sialic acid* yang terdapat pada sekret di bronkus saluran pernafasan dan permukaan sel pejamu sehingga memudahkan virus pada proses invasi dan replikasi. Protein inilah yang menjadi salah satu target antibodi yang terbentuk paska infeksi atau vaksin. Namun, virus akan melakukan evolusi untuk dapat lolos dari antibodi. Studi ini bertujuan untuk melihat evolusi yang terjadi pada genetik NA virus A/H3N2 yang beredar di Indonesia beserta prediksi perubahan antigenisitas dan epitop pada *human leukocyte antigen* (HLA) kelas II. Studi ini menggunakan sebanyak 129 spesimen NA dari Indonesia tahun 2005-2018, diperoleh dari bank data *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID). Analisa evolusi dan filodinamika dilakukan menggunakan *software* BEAST versi 1.8.3 dilanjutkan dengan analisa antigenisitas, dengan metode Kolaskar dan Tongaonkar. Analisa prediksi pengikatan MHC kelas II dilakukan menggunakan *Immune Epitope Database* (IEDb). Hasil didapatkan evolusi pada virus A/H3N2 terutama pada gen neuraminidase dengan pola *antigenic drift* sehingga terdapat dua klaster berbeda. Pada analisa keragaman genetik juga didapatkan hasil jumlah varian yang berfluktuasi dari tahun ke tahun. Sekalipun demikian, pada prediksi imunogenisitas didapatkan mayoritas sekuens memiliki prediksi yang sama. Pada studi ini juga ditemukan beberapa situs prediksi imunogenisitas mengalami penurunan atau peningkatan yang menunjukkan adanya seleksi negatif dan positif pada virus yang endemik di Indonesia.

Kata kunci: antigenisitas; gen neuraminidase; virus influenza A/H3N2

PENDAHULUAN

Influenza sebagai salah satu penyakit infeksi saluran pernafasan atas (ISPA) masih menjadi perhatian baik oleh dunia maupun pemerintah Indonesia. Walaupun prevalensi penyakit ini sudah berkurang dari 25% pada tahun 2013 menjadi 9,3% di tahun 2018, namun dampak dari penyakit ini cukup berat, yaitu dapat

menyebabkan pneumonia dan kematian.¹

Virus Influenza A subtipe H3N2 (A/H3N2) merupakan penyebab influenza yang paling dominan dibandingkan virus A/H1N1. Virus ini menyebabkan epidemi tahunan pada musim dingin di negara dengan 4 musim, sedangkan di negara tropis seperti

Indonesia, virus ini menyebabkan kasus sepanjang tahun terutama pada musim hujan.² Virus A/H3N2 yang pertama kali ditemukan pada tahun 1968 ini merupakan rekombinasi 2 gen virus influenza A avian dan sekarang menyebabkan endemik musiman di Asia.³ Virus ini memiliki dua glikoprotein permukaan yang dominan serta berperan pada proses replikasi virus, salah satunya adalah neuraminidase (NA). Neuraminidase berperan melepaskan *sialic acid* pada permukaan virion dan sel pejamu paska replikasi sehingga virion tersebut dapat terlepas dari sel pejamu serta mencegah perlekatannya dengan sel yang mati.⁴ Selain itu NA juga berperan dalam menyingkirkan *sialic acid* yang terdapat pada mucin, silia dan *glycocalyx* pada permukaan epitel pernafasan sehingga memudahkan akses virus terhadap reseptor permukaan sel pejamu.⁵ Pentingnya peranan glikoprotein NA ini, membuat virus meningkatkan aktivitasnya dengan melakukan perubahan konformasi asam aminonya atau *antigenic drift*. Perubahan 1 saja asam amino pada NA dapat meningkatkan aktivitasnya terhadap *sialic acid*.⁶ Selain untuk meningkatkan aktivitasnya, mutasi pada asam amino NA juga mempengaruhi pengenalannya oleh *major histocompatibility complex* (MHC) atau yang disebut juga *human leukocyte antigen*

(HLA) kelas II sehingga terhindar dari antibodi.⁷ Pada proses pembuatan antibodi atau imunoglobulin, diawali dengan pengenalan antigen atau epitop oleh limfosit T yang kemudian dipresentasikan pada HLA kelas II.⁸ Perubahan antigenisitas ini dapat menurunkan imunogenisitas sehingga mempengaruhi efektivitas antibodi yang terbentuk dalam netralisasi virus. Mekanisme ini menjadi masalah bagi para ahli untuk merancang komposisi atau kandidat vaksin dan menjadi alasan utama bagi ketidakberhasilan vaksin dalam mengontrol penyakit infeksius.⁹ Strain vaksin yang ada sekarang ini, merupakan hasil formulasi yang dilakukan setiap tahun oleh *Global Influenza Surveillance and Response System* (GISRS). Mereka mengasumsikan bahwa strain virus dominan pada epidemi sebelumnya dapat mendominasi epidemi selanjutnya dan perubahan asam amino yang terjadi pada masa lampau diperkirakan dapat berulang di masa depan.¹⁰ Kondisi ini, menjadi alasan perlunya perbaharuan komposisi vaksin yang direkomendasikan WHO pada tahun 1999 secara berkala.¹¹ Studi ini bertujuan untuk melihat evolusi yang terjadi pada genetik NA virus A/H3N2 yang beredar di Indonesia beserta perubahan prediksi antigenisitas dan epitop pada HLA kelas II. Pada akhirnya hasil studi ini dapat menjadi

pertimbangan dalam pemilihan kandidat vaksin influenza di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Survei dan koleksi data

Sebanyak 129 sampel NA didapatkan dari Bank Data *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID) dan jurnal yang telah dipublikasi. Kriteria inklusi untuk data sekunder tersebut adalah sekuens nukleotida influenza A/H3N2 yang berasal dari Indonesia, nukleotida tersebut merupakan regio NA dari genom influenza A/H3N2, tahun isolasi dari tahun 2003 dan terakhir sampai 31 Desember 2018. Kriteria eksklusi dari data tersebut adalah sekuens nukleotida yang didapatkan dari turis asing yang berkunjung ke Indonesia dan region gen NA yang tidak lengkap (*partial sequence*)

Analisa Evolusi

Analisa evolusi dan laju mutasi dilakukan dengan menggunakan metode *Bayesian Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) yang terdapat pada software BEAST versi 1.8 untuk melakukan estimasi rata-rata substitusi per tempat per tahun, *the most recent common ancestor* (TMRCA) dan keragaman relatif genetik. *Markov Chain Monte Carlo* dilakukan sebanyak 100 juta generasi dengan sampling dilakukan

setiap 1000 generasi untuk menghasilkan sedikitnya 100000 pohon untuk memastikan kecukupan jumlah sampel dari parameter *posterior*, *prior*, rata-rata substitusi nukleotida dan *likelihood*. Batas *effective sample size* (ESS) lebih dari 100 digunakan sebagai penanda cukupnya proses pengambilan sampel. Rata-rata laju substitusi, TMRCA dan *maximum clade credibility* (MCC) dari pohon filogenetik diperhitungkan setelah membuang 10% hasil generasi dan melakukan inspeksi secara visual dengan menggunakan software TRACER versi 1.5. Sisanya sebanyak 90000 pohon dilakukan peringkasan menggunakan *software TreeAnnotator*.

Analisa Bayesian skyline

Analisa *bayesian skyline* dilakukan dengan BEAST versi 1.8. Parameter evolusi menggunakan hasil dari *jModelTest* dengan model evolusi *relaxed clock*. Data diatur dengan menggunakan BEAUti versi 2 dan pengaturan dilakukan dengan *setting prior* menjadi *Coalescent Bayesian Skyline*. Hasil dari analisa dilihat dengan menggunakan program TRACER versi 1.5.

Analisa Prediksi Antigenisitas dan Epitop MHC kelas II

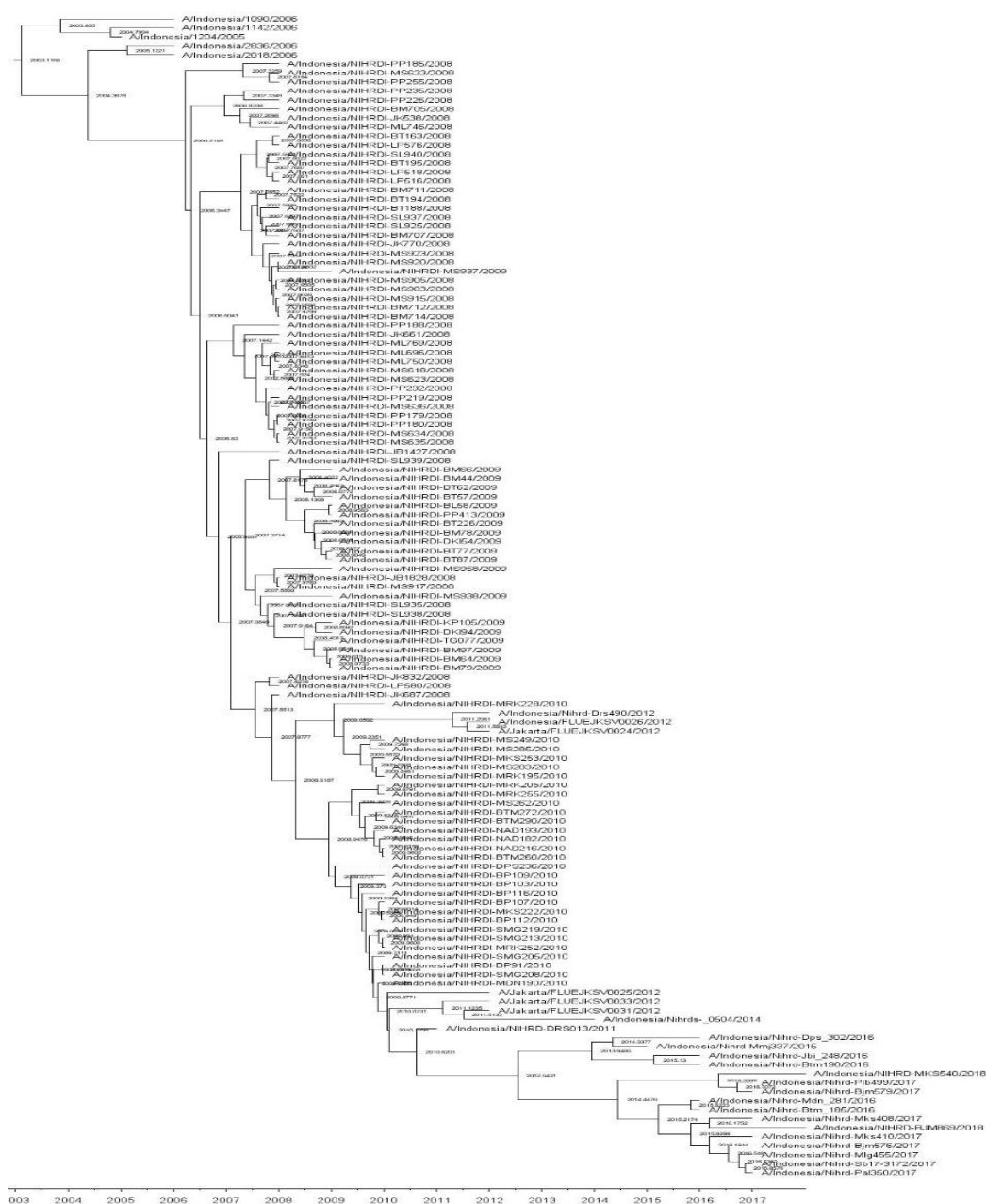
Analisa antigenisitas akan dilakukan dengan menggunakan metode *Kolaskar & Tangonkar antigenicity prediction*.

Analisis *consens* MHC kelas II menggunakan software IEDB (*Immune Epitope Data Base*) dengan metode *consensus*.

HASIL PENELITIAN

Hasil analisa evolusi untuk NA virus A/H3N2 didapatkan adanya 2 varian virus pada tahun 2018, yaitu NIHRD-MKS540

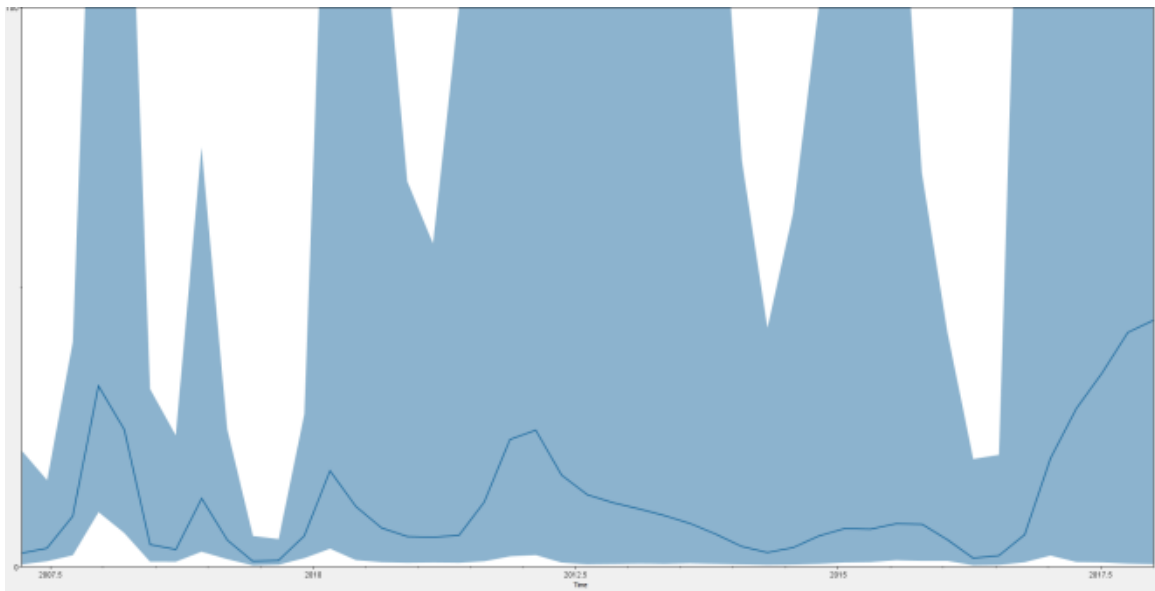
dan NIHRD-BJM869. Kedua varian ini memiliki titik pemisahan yang berbeda sehingga terbagi menjadi dua kluster sekalipun berasal dari *the most recent common ancestor* (TMRCA) yang sama (Gambar 1). Pemisahan tersebut diperkirakan terjadi pada pertengahan tahun 2014 yang menunjukkan terjadinya *genetic drift* virus A/H3N2.



Gambar 1. Philogenetik evolusi gen NA dari IAV H3N2 yang beredar di Indonesia

Perubahan keragaman genetik yang dianalisis menggunakan *bayesian skyline*, didapatkan adanya peningkatan keragaman genetik pada gen NA virus A/H3N2 yang terjadi pada akhir tahun

2007 sampai pertengahan 2008, sedikit pada tahun 2009 sampai pertengahan 2010, tahun 2011 sampai 2012, tahun 2015 dan awal tahun 2017. (Gambar 2)



Gambar 2. *Bayesian skyline plot* dari gen NA. Sumbu x merupakan penanda waktu (tahun) dan sumbu y merupakan perhitungan relatif dari keragaman genetik. Garis biru merupakan nilai median sementara area berwarna biru merupakan *95% confidence interval*.

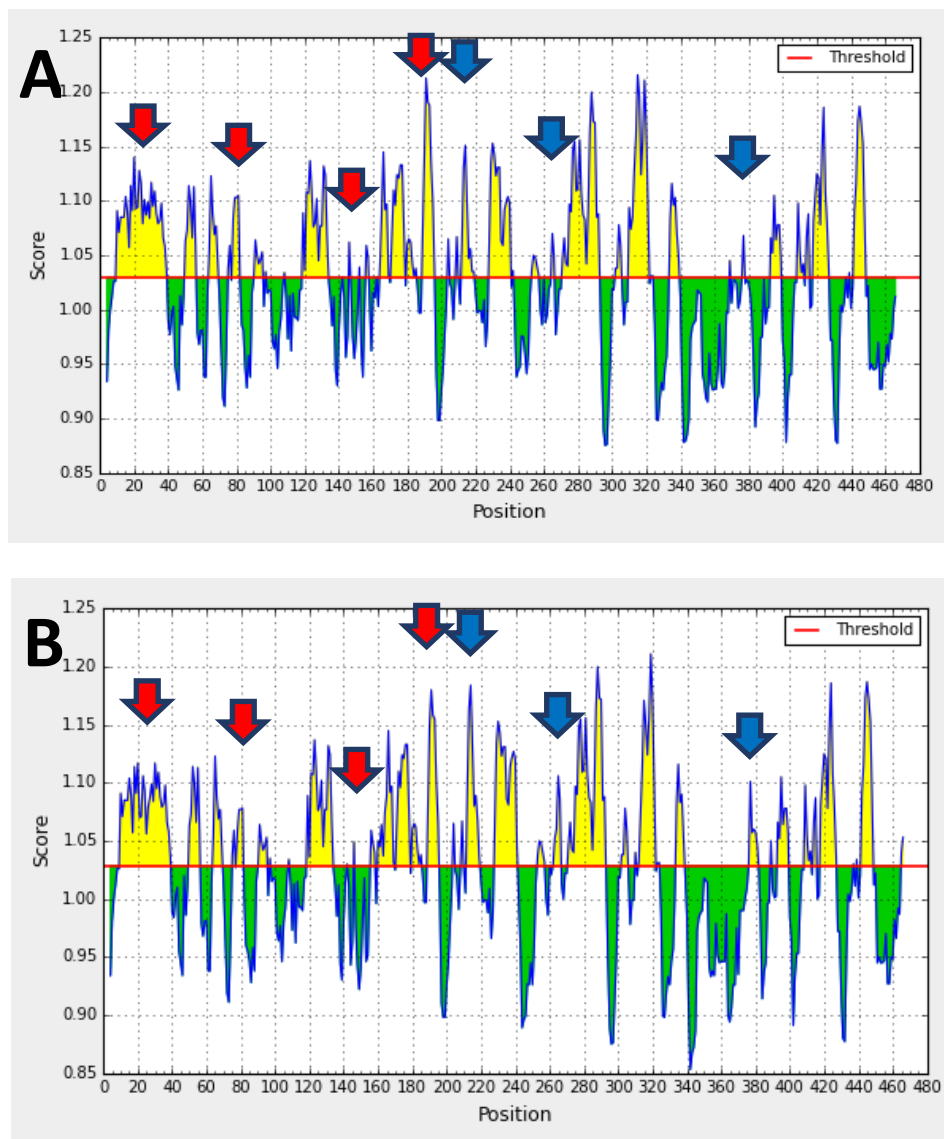
Analisis prediksi antigenisitas dengan metode *Kolaskar* dan *Tongaonkar*. Metode ini merupakan metode semi empiris yang menggunakan karakter fisiokimia dari asam amino dan frekuensi kemunculan mereka melalui eksperimen yang dikembangkan untuk memprediksi antigenisitas pada protein. Metode ini diketahui dapat memprediksi antigenisitas dengan ketepatan sampai 75%. Pada studi ini ditemukan beberapa prediksi sekuens yang bersifat antigenisitas dan keberadaannya ditemukan

pada setiap spesimen yang dilaporkan. (Tabel 1)

Sekalipun banyak sekuens asam amino yang bersifat *conserved*, setelah dibandingkan antara sekuens tahun 2005 dengan tahun 2018 didapatkan adanya penurunan dan peningkatan indeks antigenisitas pada beberapa lokasi (gambar 3). Penurunan didapatkan pada perkiraan posisi 22, 80, 144 dan 185, sedangkan peningkatan didapatkan pada perkiraan posisi 219, 252 dan 358.

Tabel 1. Prediksi antigenisitas yang ditemukan conserved pada setiap spesimen yang dilaporkan untuk kedua gen

No	Gen	Posisi	Urutan asam amino
1	NA	10 – 39	IGSVSLTISTICCFMQIAILITTVTLHFKQ
2	NA	50 – 56	VMLCEPT
3	NA	64 – 69	EIVYLT
4	NA	119 – 133	EPYVSCDPDKCYQFA
5	NA	160 – 169	MSELGVPFHL
6	NA	171 – 178	TKQVCIAW
7	NA	180 – 185	SSSCHD
8	NA	189 – 195	WLHVCIT
9	NA	212 – 219	VDSVVSWS
10	NA	228 – 241	SECVCINGTCAVVM
11	NA	271 – 292	SAQHVEECSCYPRYPGVRCVCR
12	NA	312 – 321	IASSYVCSGL
13	NA	393 – 399	NRQVIVD
14	NA	418 – 427	INRCFYVELI
15	NA	442 – 448	SIVVFCG



Gambar 3. Perbandingan antigenisitas gen NA tahun 2005 (A) dan tahun 2018 (B). Nampak terjadinya penurunan antigenisitas (panah merah) dan peningkatan antigenisitas (panah biru) pada beberapa lokasi.

Hasil analisa prediksi pengikatan MHC kelas II terhadap gen NA antara sampel tahun 2005 dengan sampel tahun 2018 didapatkan adanya prediksi yang *conserved*, namun pada beberapa area

didapatkan skor antigenisitas yang berubah. Pada urutan 16-30 dan 21-35 didapatkan perubahan 1 asam amino yang menyebabkan terjadinya perubahan skor antigenisitas. (Tabel 2)

Tabel 2. Perbandingan prediksi pengikatan MHC kelas II dari gen NA antara spesimen yang diisolasi tahun 2005 dan tahun 2018

2005					2018				
Peptide	Start	End	Combined Score	Immunogenicity Score	Peptide	Start	End	Combined Score	Immunogenicity Score
MNPNQKIITIGSVSL	1	15	4.236.596	966.599	MNPNQKIITIGSVSL	1	15	4.236.596	966.599
KIITIGSVSLTISTI	6	20	4.587.748	980.587	KIITIGSVSLTISTI	6	20	4.587.748	980.587
TISTICFLMQIAILI	16	30	4.034.844	944.511	TISTICFFMQIAILI	16	30	4.095.648	958.962
CFLMQIAILITTVTL	21	35	3.564.304	852.676	CFFMQIAILITTVTL	21	35	35.954	83.39
IAILITTVTLHFKQY	26	40	382.928	85.862	IAILITTVTLHFKQY	26	40	382.928	85.862
PNNQVMLCEPTIIEER	46	60	455.954	841.835	PNNQVMLCEPTIIEER	46	60	455.954	841.835
NITEIVYLTNTTIEK	61	75	311.788	70.507	NITEIVYLTNTTIEK	61	75	311.788	70.507
GFAPFSKDNSIRLSA	96	110	2.933.808	648.702	GFAPFSKDNSIRLSA	96	110	2.933.808	648.702
SKDNSIRLSAGGDIW	101	115	4.738.532	892.583	SKDNSIRLSAGGDIW	101	115	4.738.532	892.583
-	-	-	-	-	QGTTLNNVHSNNTVR	136	150	418.992	80.913
-	-	-	-	-	NNTVRDRTPYRTLLM	146	160	4.982.172	939.843
NRTPYRTLLMNELGV	151	165	474.382	888.505	-	-	-	-	-
RTLLMNELGVPFHLG	156	170	4.599.104	929.726	RTLLMSELGVPFHLG	156	170	4.856.764	980.341
TKQVCIAWSSSSCHD	171	185	4.990.736	911.384	TKQVCIAWSSSSCHD	171	185	4.990.736	911.384
IYNGRLVDSIVSWSK	206	220	4.512.468	974.367	IYNGRLVDSVVSWSK	206	220	4.985.996	978.149
LVDSIVSWSKDILRT	211	225	4.855.796	968.699	-	-	-	-	-
DTKILFIEEGKIVRT	251	265	3.967.452	887.613	DTKILFIEEGKIVHT	251	265	4.233.908	916.427
FIEEGKIVRTSTLSG	256	270	468.696	89.604	-	-	-	-	-
NIKDYIVSSSYVCSG	306	320	37.982	85.085	-	-	-	-	-
ISEKLRLGYETFKVI	366	380	4.961.084	869.771	-	-	-	-	-
TFKVIEGWSNPNSKL	376	390	4.703.812	859.303	TFKVVEGWSNPNSKL	376	390	4.356.756	866.139
PNSKLQINRQVIVDR	386	400	4.216.856	904.664	PKSKLQINRQVIVDR	386	400	4.308.776	927.644
QINRQVIVDRGNRSG	391	405	4.960.296	964.224	-	-	-	-	-
CFYVELIRGRKEETE	421	435	4.638.228	830.907	CFYVELIRGRKEETE	421	435	4.638.228	830.907
KEETEVLWTSNSIVV	431	445	436.488	78.897	KEETEVLWTSNSIVV	431	445	436.488	78.897
VLWTSNSIVVFCGTS	436	450	4.639.568	873.692	VLWTSNSIVVFCGTS	436	450	4.639.568	873.692

PEMBAHASAN

Hasil studi ini didapatkan 2 kluster virus pada tahun 2018, yang berasal dari *the most recent common ancestor* (TMRCAs) yang sama (Gambar 1). Pada filogenetik tersebut nampak pemisahan kluster yang diperkirakan terjadi pada tahun 2014,

menunjukkan adanya evolusi pada kluster sebelumnya. Evolusi yang terbentuk karena terjadinya mutasi pada gen NA yang menunjukkan terjadinya *genetic drift* pada virus A/H3N2. Evolusi yang terjadi ini akan mengalami seleksi positif maupun seleksi negatif dimasa yang akan

datang, namun belum dapat diprediksi klaster mana. Mutasi, walaupun pada salah satu poin gen, dapat mempengaruhi antigenisitas dan pengenalan antibodi terhadap protein yang di ekspresikan virus tersebut. Mutasi pada NA dapat berhubungan dengan terhindarnya virus dari antibodi yang terbentuk.¹²

Peningkatan keragaman genetik pada gen NA virus A/H3N2 yang terjadi pada akhir tahun 2007 sampai pertengahan 2008, tahun 2009 sampai pertengahan 2010, tahun 2011 sampai 2012, tahun 2015 dan akhir tahun 2017 (Gambar 2), kemungkinan dipengaruhi oleh cuaca atau temperatur atau paparan dengan varian virus pada vaksin yang terjadi di Indonesia. Pada studi Jiang dkk terhadap virus influenza H1N1 didapatkan korelasi positif antara mutasi pada virus influenza H1N1 dengan perubahan temperatur (cuaca), perkembangan lingkungan sosial dan kepadatan penduduk.¹³ Besarnya jumlah dan keragaman populasi juga memungkinkan terbentuknya varian virus influenza yang baru.¹⁴ *World health organization* (WHO) mengatakan bahwa migrasi populasi, transportasi dan perdagangan global serta kepadatan meningkatkan penyebaran virus tanpa menghiraukan batasan negara, status sosial, status ekonomi dan usia.¹⁵

Analisis prediksi antigenisitas menggunakan metode *Kolaskar* dan

Tongaonkar didapatkan beberapa prediksi sekuens yang bersifat antigenisitas dan keberadaannya ditemukan pada setiap spesimen yang dilaporkan (Tabel 1). Pada perbandingan variasi sekuens asam amino dengan sekuens tahun 2005 didapatkan penurunan dan peningkatan indeks antigenisitas sekuens tersebut (Gambar 3). Perubahan antigenisitas ini dapat mempengaruhi pengenalan komponen imun sehingga cukup penting bagi perkembangan vaksinasi influenza.¹⁶

Hasil analisa prediksi pengikatan MHC kelas II terhadap gen NA juga didapatkan adanya perubahan skor antigenisitas yang bervariasi pada prediksi yang *conserved* (Tabel 2). Terdapatnya *overlap* pada beberapa sekuens dapat mempengaruhi skor antigenisitas. Perubahan susunan asam amino juga dapat menyebabkan hilangnya prediksi antigenisitas atau munculnya prediksi antigenisitas yang baru. Perubahan asam amino, salah satunya pada gen NA, yang terjadi setiap tahun ini menunjukkan terjadinya *antigenic drift* pada virus A/H3N2. Proses evolusi virus A/H3N2 ini merupakan mekanisme virus untuk menghindari sistem imun pejamu dan terjadinya seleksi negatif atau positif. Apabila varian baru ini mampu bertahan dari sistem kekebalan tubuh pejamu (seleksi positif) maka kemungkinan virus tersebut dapat

menjadi virus yang dominan. Pentingnya memprediksi varian virus sebagai akibat terjadinya *antigenic drift* ini penting untuk prediksi efektifitas kandidat vaksin.¹⁷

Studi ini dilakukan dengan metode prediksi sehingga pembuktian lebih lanjut untuk memastikan pengaruh langsung evolusi terhadap antigenisitas dan pengikatan MHC kelas II perlu dilakukan. Dengan adanya hasil studi ini, pembuktian lebih lanjut dapat dilakukan dengan lebih terarah. Kurangnya jumlah spesimen yang diperoleh, terutama pada tahun 2005, 2006 dan tahun 2012, menyebabkan kurang akuratnya informasi yang didapatkan pada proses perhitungan evolusi dan prediksi. Spesimen yang didapatkan pada penelitian ini hanya memiliki data tahun sehingga tidak dapat memprediksi waktu terjadinya evolusi dengan lebih akurat. Agustini¹⁸ melaporkan bahwa umumnya peningkatan keragaman genetik pada virus influenza terjadi di musim hujan. Perlu diketahui bahwa metode prediksi antigenisitas tidak dapat menjamin akurasi strain virus yang akan mendominasi. Faktor-faktor seperti proses sampling atau munculnya mutasi secara *de novo* setelah epidemi yang terjadi di masa lalu dapat mempengaruhi hasil metode prediksi ini, selain masih

belum jelasnya mekanisme evolusi virus.¹⁹

KESIMPULAN

Pada studi ini didapatkan adanya evolusi gen neuraminidase (NA) yang terbagi menjadi dua klaster yang berbeda walaupun pada akhirnya hanya salah satu klaster yang mengalami seleksi positif dan berevolusi lebih lanjut. Pemisahan klaster tersebut diperkirakan terjadi pada pertengahan tahun 2014 yang memaksa terjadinya *genetic drift*. Penyebab proses seleksi tersebut dapat berupa musim ataupun introduksi vaksin. Hal ini juga bisa dilihat dari fluktuasi dari analisa keragaman antara tahun 2005 hingga tahun 2018. Keragaman ini diperkirakan sangat dipengaruhi cuaca yang terjadi di Indonesia. Sayangnya data spesimen tidak spesifik untuk waktu (tanggal atau bulan) spesimen didapatkan sehingga tidak dapat diprediksi faktor yang mempengaruhi terjadinya mutasi atau evolusi. Pada prediksi antigenisitas didapatkan mayoritas sekuens memiliki antigenisitas yang sama, namun didapatkan pula beberapa area yang mengalami penurunan atau peningkatan antigenisitas. Hasil analisis prediksi pengikatan oleh MHC kelas II didapatkan mayoritas *conserved*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kementerian Kesehatan RI. Hasil utama RISKESDAS 2018. Kementerian kesehatan Republik Indonesia.2018 Available from: https://kesmas.kemkes.go.id/assets/upload/di_r_519d41d8cd98f00/files/Hasil-risikesdas-2018_1274.pdf
2. Nelson MI, Simonsen L, Viboud C, Miller MA, Holmes EC. Phylogenetic Analysis Reveals the Global Migration of Seasonal Influenza A Viruses. *PLOS Pathog.* 2007;3:e131.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1968 Pandemic (H3N2 virus) [Internet]. CDC. 2019. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/1968-pandemic.html>
4. Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology.* 1974;61(2):397-410.
5. McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, Breschkin JLM. Influenza virus neuraminidase structure and functions. *Front Microbiology.* 2019;10:[39 p.]
6. Kobasa D, Rodgers ME, Wells K, Kawaoka Y. Neuraminidase hemadsorption activity, conserved in avian influenza A viruses, does not influence viral replication in ducks. *J Virol.* 1997;71(9):6706-13.
7. Allen JD, Ross TM. H3N2 influenza viruses in humans: Viral mechanisms, evolution, and evaluation. *Hum. Vaccines Immunother.* 2018;14(8):1840-7.
8. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. Antigen presentation to T lymphocytes and the Functions of Major Histocompatibility Complex Molecules. In: Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S, editors. *Cellular and Molecular Immunology.* 9th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences. 2017. p.117-42.
9. Ye Q, Shang S, Li W. A New Vaccine Escape Mutant of Hepatitis B Virus Causes Occult Infection. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(2): 407-10.
10. Treanor J. Weathering the Influenza Vaccine Crisis. *N Engl J Med.* 2004;351(20):2037-40.
11. Stöhr, K. Influenza—WHO cares. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(9):517.
12. Prachanonrarong KL, Canale AS, Liu P, Somasundaran M, Hou S, Poh Y, et al. Mutations in Influenza A Virus Neuraminidase and Hemagglutinin Confer Resistance Against a Broadly Neutralizing Hemagglutinin Stem Antibody. *J Virol.* 2019; 93(2):e01639-18.
13. Jiang D, Wang Q, Bai Z, Qi H, Ma J, Liu W, et al. Could environment affect the mutation of H1N1 influenza virus?. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(9):3092.
14. Cobbin JCA, Alfelali M, Barasheed O, Taylor J, Dwyer DE, Kok J, et al. Multiple sources of genetic diversity of influenza A viruses during hajj. *J Virol.* 2017; 91(11):e00096-17.
15. World Health Organization. Influenza (Seasonal) [Internet]. WHO. 2018. Available from: [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/influenza-(seasonal))
16. Valkenburg SA, Rutigliano JA, Ellebedy AH, Doherty PC, Thomas PG, Kedzierska K. Immunity to Seasonal and Pandemic Influenza A Viruses. *Microbes Infect.* 2011;3(5):489-501.
17. Naeem A, Elbakkouri K, Alfaiz A, Hamed ME, Alsaran H, AlOtaiby A, et al. Antigenic drift of hemagglutinin and neuraminidase in seasonal H1N1 influenza viruses from Saudi Arabia in 2014 to 2015. *J Med Virol.* 2020;10.1002/jmv.25759.
18. Agustini Sih A, Trimarsanto H, Restuadi R, Artika IM, Hellard M, Muljono DH. Evolutionary study and phylodynamic pattern of human influenza A/H3N2 virus in Indonesia from 2008 to 2010. *PLOS ONE.* 2018;13:e0201427
19. Suzuki Y. Predictability of antigenic evolution for H3N2 human influenza A virus. *Genes Genet Syst.* 2013;88(4):225–32.