

# Pengaruh evolusi virus H3N2 pada perubahan hemagglutinin, neuraminidase dan efeknya terhadap *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II di Indonesia pada tahun 2005-2019

Alvian Rendy Santoso<sup>1</sup>, Erick Sidarta<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jakarta, Indonesia

<sup>2</sup> Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara, Jakarta, Indonesia

\*korespondensi email: ericksi@fk.untar.ac.id

## ABSTRAK

Virus H3N2 merupakan salah satu virus yang dapat menyebabkan terjadinya epidemi dan pandemi di seluruh belahan dunia. Di Indonesia sendiri, virus ini merupakan penyebab 64,6% penyakit influenza. Virus H3N2 merupakan virus RNA yang dapat berevolusi dengan cepat sehingga dapat menyebabkan terjadinya kegagalan vaksinasi ataupun respon imun yang tidak sempurna dalam mengeliminasi virus. Molekul *major histocompatibility complex* (MHC) kelas II adalah komponen yang penting bagi respon imun dalam proses mengeliminasi virus. Pada proses ini, sel T *helper* akan teraktivasi dan menghasilkan sitokin yang menstimulasi sel imun lainnya. Tujuan studi ini adalah mengetahui pengaruh evolusi virus H3N2 Indonesia pada perubahan hemagglutinin, neuraminidase dan efeknya terhadap pengikatan MHC kelas II pada tahun 2005 - 2019. Data 133 gen HA dan 130 gen NA virus H3N2 di Indonesia tahun 2005 sampai 2019 diperoleh melalui bank data *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID). Evaluasi dilakukan secara *in silico* berupa pembangunan pohon filogenetik melalui *software* MEGA X, uji pengikatan MHC kelas II melalui *Immune Epitope Data Base* (IEDB) dan uji antigenisitas melalui *software* Vaxijen 2.0. Pada pohon filogenetik menunjukkan kekerabatan antar sekuens dan terjadinya *antigenic drift* pada virus H3N2 di Indonesia. Hasil uji pengikatan MHC kelas II dan antigenisitas menunjukkan adanya perubahan skor akibat terbentuknya beberapa variasi epitop seperti pada *predicted sites* 151-165 dengan skor 0.7728 → 0.4373. Pada studi ini didapatkan juga beberapa epitope sebagai prediksi pembuatan vaksin seperti *predicted sites* 441-455 gen HA. Evolusi virus H3N2 di Indonesia mengakibatkan terjadinya perubahan atau hilangnya prediksi pengikatan terhadap MHC kelas II dan HLA dominan.

**Kata kunci:** evolusi virus H3N2, Indonesia, Hemagglutinin, Neuraminidase, MHC kelas II

## PENDAHULUAN

Penyakit pernafasan, seperti rhinitis merupakan salah satu penyakit yang umum ditemukan dalam masyarakat. Salah satu penyebab utamanya adalah virus influenza. *World Health Organization* (WHO) memperkirakan sebanyak 5-15% penduduk dunia terinfeksi virus influenza. Virus ini

menyumbang angka kematian sebanyak 250.000 – 500.000 jiwa setiap tahunnya. Virus H3N2 adalah salah satu subtipe virus influenza yang pernah menyebabkan banyak korban jiwa. Sejarah mencatat empat pandemi utama virus H3N2 yang pernah terjadi di dunia dengan korban jiwa mencapai jutaan

jiwa.<sup>1</sup> Di Indonesia, menurut hasil penelitian oleh Kosasih H et al. yang mengamati penyakit influenza di Indonesia tahun 2003 sampai 2007 mengatakan bahwa 64,9% penyebab *Influenza Like Illness* (ILI) di Indonesia adalah virus Influenza A dengan 64,6% diantaranya merupakan virus H3N2.<sup>2</sup>

Secara struktur, virus influenza merupakan virus *Ribonucleic Acid* (RNA) yang memiliki berbagai protein sebagai komponen utama virus. Pada protein tersebut terdapat 2 jenis antigen permukaan utama yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA). Kedua antigen ini berperan dalam menentukan subtype suatu virus influenza A (VIA). Selain itu, antigen HA dan NA berperan penting dalam proses fusi ke sel dan pelepasan virus yang baru dari sel inang. Oleh karenanya, penting bagi sistem imun untuk memproduksi antibodi terhadap HA dan NA influenza untuk mencegah terjadinya fusi dan menetralkan virus tersebut.<sup>3-5</sup>

Pada proses pembentukan antibodi memerlukan peran sel T CD4+ yang teraktivasi setelah mengenali antigen yang dipresentasikan oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) melalui Molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II. Pengenalan antigen ini sangat penting sebagai proses awal dalam eliminasi virus. Melalui pengenalan ini,

sel T CD4+ akan mengaktivasi atau meningkatkan kerja berbagai sel imun lainnya. Walau demikian, respon imun terhadap virus terkadang tidak terjadi secara optimal dikarenakan adanya mekanisme penghindaran imunitas oleh virus itu sendiri. Penghindaran ini dapat terjadi melalui *antigenic drift* maupun *antigenic shift*.<sup>6-8</sup>

Mekanisme penghindaran respon imun ini membuat virus H3N2 merupakan salah satu penyebab utama *outbreak* influenza yang sering terjadi di berbagai belahan dunia jika dibandingkan dengan tipe dan subtype virus influenza lainnya. Sejak kemunculannya di tahun 1968, virus H3N2 telah bersirkulasi di seluruh belahan dunia dan terus mengalami evolusi yang menyebabkan banyak epidemi musiman dan kesulitan dalam pembuatan vaksin. Bahkan, studi terbaru mengenai vaksin influenza H3N2 di Amerika Serikat dan Eropa dari tahun 2016/2017 menunjukkan efektifitas yang buruk dalam semua kategori usia.<sup>9</sup>

Studi oleh Agustiniingsih et al. meneliti mengenai data evolusi yang ada di seluruh belahan dunia, namun tidak menonjolkan informasi mengenai prediksi pengikatan virus terhadap MHC kelas II yang penting dalam pertimbangan pembuatan vaksin. Kurangnya pengetahuan akan pengaruh evolusi virus H3N2 terhadap prediksi pengikatan virus terhadap MHC kelas II

membuat penulis ingin mengetahui perkembangan terbaru evolusi yang terjadi pada virus H3N2 di Indonesia sebagai tambahan data pertimbangan pembuatan vaksin diantaranya seperti vaksin sel T Influenza dengan memprediksi posisi asam amino yang mengalami evolusi pada antigen HA dan NA dan pengaruhnya terhadap pengenalan antigen melalui MHC kelas II yang penting dalam memicu proses imun.<sup>10</sup>

## **METODE PENELITIAN**

### **Survei dan koleksi data**

Sebanyak 133 sampel HA dan 130 sampel NA didapatkan dari Bank Data *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID). Kriteria inklusi untuk data sekunder adalah sekuens nukleotida lengkap gen HA dan NA virus influenza A/H3N2 yang berasal dari Indonesia sejak 1 Januari 2005 sampai 31 Desember 2019. Kriteria eksklusi adalah sekuens nukleotida yang didapatkan dari turis asing yang berkunjung ke Indonesia serta region gen HA dan NA yang tidak lengkap (*partial sequence*).

### **Analisa filogenetik**

Analisa filogenetik dilakukan dengan metode *Maximum Likelihood* dengan *bootstrap* sebanyak 1000 kali

pengulangan dan pemodelan substitusi *General Time Reversible* (GTR) melalui *software* MEGA X.

### **Analisa prediksi antigenisitas dan epitop MHC kelas II**

Analisa antigenisitas dilakukan menggunakan *software* Vaxijen 2.0 dengan *threshold* 0.7. Analisa epitop MHC kelas II menggunakan *software* IEDB (*Immune Epitope Data Base*) dengan metode IEDB recommended dengan *threshold* 60.

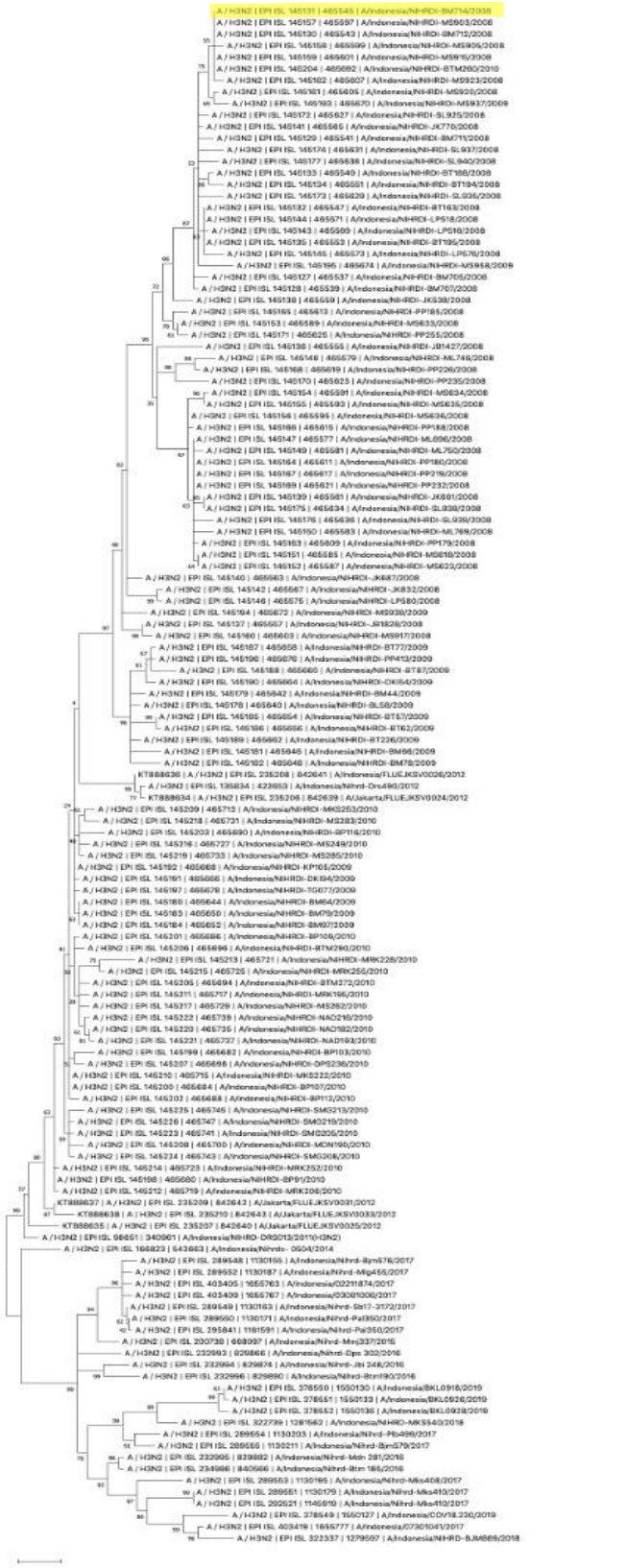
## **HASIL PENELITIAN**

### **Pohon Filogenetik HA dan NA**

Pohon filogenetik HA dan NA menunjukkan kekerabatan antar sekuens pada pohon tersebut. Pada hasil dari pembangunan pohon filogenetik ini diperoleh sekuens BM714/2008 sebagai *ancestor* pada kedua gen yang ditunjukkan pada Gambar 1 dan 2. Sekuens ini merupakan data tertua dengan kekerabatan yang terjauh dibanding sekuens lainnya.

### **Uji pengikatan MHC kelas II dan antigenisitas pada Ancestor**

Hasil kedua uji ini diperoleh 13 *predicted sites* gen HA dan 10 *predicted sites* gen NA yang ditunjukkan pada Tabel 1 dan 2 yang mampu menimbulkan respon imun dan bersifat antigenik.



Gambar 1. Pohon filogenetik gen HA Virus H3N2 di Indonesia tahun 2005-2019 melalui MEGA X. Ancestor: BM714/2008 (Kotak kuning)



Gambar 2. Pohon filogenetik gen NA virus H3N2 di Indonesia tahun 2005-2019 melalui MEGA X. Ancestor: BM714/2008 (Kotak kuning)

**Tabel 1. Hasil uji pengikatan MHC kelas II dan antigenisitas *ancestor* BM 714/2008 gen HA**

<i>Predicted Sites</i>	<i>MHC Class II binding peptides</i>	Skor Pengikatan MHC kelas II (IEDB)	Skor Antigenisitas (Vaxijen 2.0)
1 s/d 15	MKTIIALSYILCLVF	99.1264	0.7091 (Probable ANTIGEN).
6 s/d 20	ALSYILCLVFAQKLP	93.8837	0.8204 ( Probable ANTIGEN ).
151 s/d 165	TSSACIRRSNSSFFS	89.4596	0.7728 ( Probable ANTIGEN ).
156 s/d 170	IRRSNSSFFSRLNWL	93.8415	1.0024 ( Probable ANTIGEN ).
161 s/d 175	SSFFSRLNWLTHSKF	78.4183	0.7243 ( Probable ANTIGEN ).
166 s/d 180	RLNWLTHSKFKYPAL	76.5110	0.9473 ( Probable ANTIGEN )
226 s/d 240	QQTVIPNIGSRPRIR	97.0321	0.9712 ( Probable ANTIGEN ).
236 s/d 250	RPRIRNIPSRISIW	89.8637	0.7583 ( Probable ANTIGEN ).
246 s/d 260	ISIWYWTIVKPGDILL	91.0264	0.8473 ( Probable ANTIGEN ).
441 s/d 455	AELLVALENQHTIDL	97.4816	0.8843 ( Probable ANTIGEN ).
526 s/d 540	GYKDWILWISFAISC	85.4918	1.0992 ( Probable ANTIGEN ).
531 s/d 545	ILWISFAISCFLLCV	84.9087	1.1796 ( Probable ANTIGEN ).
536 s/d 550	FAISCFLLCVALLGF	98.8070	0.8794 ( Probable ANTIGEN ).

**Tabel 2. Hasil uji pengikatan MHC kelas II dan antigenisitas *ancestor* BM 714/2008 gen NA**

<i>Predicted Sites</i>	<i>MHC Class II binding peptides</i>	Skor pengikatan MHC kelas II (IEDB)	Skor Antigenisitas (Vaxijen 2.0)
1 s/d 15	MNPNQKIITIGSVSL	96.6599	1.1924 ( Probable ANTIGEN ).
6 s/d 20	KIITIGSVSLTISTI	98.0587	1.2564 ( Probable ANTIGEN ).
16 s/d 30	TISTICFFMQIAILI	95.8962	0.9718 ( Probable ANTIGEN ).
21 s/d 35	CFFMQIAILITTVTL	83.3900	1.0372 ( Probable ANTIGEN ).
26 s/d 40	IAILITTVTLHFKQY	85.8620	1.2342 ( Probable ANTIGEN ).
61 s/d 75	NITEIVYLTNTTIEK	70.5070	0.7920 ( Probable ANTIGEN ).
171 s/d 185	TKQVCIWSSSSCHD	91.1384	1.0203 ( Probable ANTIGEN ).
251 s/d 265	DTKILFIEEGKIVHT	91.6427	0.8914 ( Probable ANTIGEN ).
301 s/d 315	PIVDINIKDYSIVSS	93.2416	1.6367 ( Probable ANTIGEN ).
306 s/d 320	NIKDYSIVSSYVCSG	85.0850	0.8327 ( Probable ANTIGEN ).

**Perubahan urutan asam amino dan skor antigenisitas epitop di *predicted sites***

Mutasi asam amino pada sekuens tahun lainnya dibandingkan dengan sekuens *ancestor* memperlihatkan terbentuknya berbagai variasi epitop pada *predicted*

*sites*. Variasi epitop yang terbentuk akibat mutasi asam amino pada *predicted sites* mengakibatkan perubahan pada skor antigenisitas yang melambangkan perubahan daya ikat variasi epitop tersebut terhadap MHC kelas II. Hasil tersebut ditunjukkan pada Tabel 3 dan 4.

**Tabel 3. Perubahan asam amino pada epitop di *predicted sites* yang menyebabkan perubahan skor antigenisitas sesuai tahun perubahannya pada gen HA**

<i>Predicted Sites</i>	<i>MHC Class II binding peptides</i>	Tahun Mutasi	Jumlah Varian (n)	Hasil Perbandingan Antigenisitas terhadap Ancestor (n)
1 S/D 15	MKTIIALSYILCLVF	2008	4	Naik (3), Non Antigenik (1)
		2016	1	Naik
		2017	1	Non Antigenik
		2019	2	Naik (2)
6 S/D 20	ALSYILCLVFAQKLP	2008	4	Naik (1), Turun (1), Non Antigenik (2)
		2009	1	Non Antigenik
		2012	1	Turun
		2016	1	Naik
		2017	1	Turun
		2018	1	Naik
151 s/d 165	TSSACIRRSNSSFFS	2008	4	Naik (2), Non Antigenik (2)
		2009	1	Naik
		2010	2	Naik (2)
		2012	2	Naik (1), Non Antigenik (1)
		2014	1	Non Antigenik
		2015	1	Naik
		2016	3	Non Antigenik (3)
		2017	3	Naik (2), Non Antigenik (1)
		2018	1	Naik
		2019	2	Naik (1), Non Antigenik (1)
156 s/d 170	IRRSNSSFFSRLNWL	2008	4	Turun (3), Non Antigenik (1)
		2009	1	Naik
		2010	2	Naik (2)
		2012	2	Naik (1), Turun (1)
		2014	1	Turun
		2015	1	Naik
		2016	3	Turun (3)
		2017	2	Naik (2)
		2019	1	Turun
161 s/d 175	SSFFSRLNWLTHSKF	2008	2	Naik (2)
		2009	1	Naik
		2010	1	Non Antigenik
		2012	1	Naik
		2015	1	Naik
		2017	1	Naik
166 s/d 180	RLNWLTHSKFKYPAL	2008	3	Naik (3)
		2009	1	Naik
		2010	2	Naik
		2015	1	Naik
226 s/d 240	QQTVIPNIGSRPRIR	2008	1	Naik
		2009	2	Turun (2)
		2011	1	Turun
		2017	1	Naik
236 s/d 250	RPRIRNIPSRISIW	2008	2	Turun (1), Tetap (1)
		2015	1	Naik
246 s/d 260	ISIWTVKPGDILL	2008	3	Naik (1), Turun (2)
441 s/d 455	AELLVALENQHTIDL			Tidak Ada
526 s/d 540	GYKDWILWISFAISC	2008	4	Naik (2), Turun (2)
		2009	1	Naik
531 s/d 545	ILWISFAISCFLLCV	2008	4	Naik (3), Turun (1)
		2009	1	Turun
536 s/d 550	FAISCFLLCVALLGF	2008	5	Naik (4), Non Antigenik (1)
		2009	1	Turun

**Tabel 4. Perubahan asam amino pada epitop di *predicted sites* yang menyebabkan perubahan skor antigenisitas sesuai tahun perubahannya pada gen NA.**

<i>Predicted Sites MHC Class II binding peptides</i>	Tahun Mutasi	Jumlah varian (n)	Hasil Perbandingan Antigenisitas terhadap <i>Ancestor</i> (n)
1 s/d 15	MNPNQKIITIGSVSL	2008	Turun
6 s/d 20	KIITIGSVSLTISTI	2008	Turun (1), Naik (1)
		2017	Naik
16 s/d 30	TISTICFFMQIAILI	2008	Naik (1), Turun (2), Non Antigenik (1)
		2017	Naik
21 s/d 35	CFFMQIAILITTVTL	2008	Turun (2)
26 s/d 40	IAILITTVTLHFKQY	2008	Turun
		2009	Turun
61 s/d 75	NITEIVYLTNTTIEK	2008	Turun (3)
		2010	Naik (1), Turun (2)
		2016	Naik
		2017	Turun
171 s/d 185	TKQVCIWSSSSCHD	2009	Turun
		2016	Turun
251 s/d 265	DTKILFIEEGKIVHT	2008	Turun (1), Non Antigenik (1)
		2017	NAik (1), Non Antigenik (1)
301 s/d 315	PIVDINIKDYSIVSS	2008	Turun (4)
		2010	Turun
		2011	Turun
		2012	Turun (2)
		2016	Turun (1)
		2017	Turun (2)
306 s/d 320	NIKDYSIVSSYVCSG	2008	Non Antigenik (3)
		2009	Non Antigenik
		2010	Turun
		2012	Turun (2)
		2017	Non Antigenik (2)

## PEMBAHASAN

### Pohon filogenetik HA dan NA

Pada pohon filogenetik HA dan NA, sekuens tahun sama cenderung berkelompok dan membentuk percabangan dengan tahun sebelumnya. Hal ini menandakan bahwa sekuens dengan tahun yang sama memiliki genetik yang serupa dan percabangan yang ada menunjukkan bahwa sekuens tahun tertentu merupakan hasil perkembangan sekuens tahun sebelumnya. Pada sekuens tahun 2019, baik pada gen HA dan NA,

terbagi menjadi dua kluster yang berbeda dan masing-masing kluster berpotensi berkembang lebih lanjut di tahun selanjutnya.

### Uji pengikatan MHC kelas II dan antigenisitas pada *ancestor*

Hasil kedua uji terhadap *ancestor* BM714/2008 pada studi ini menghasilkan 13 *predicted sites* (Gen HA) dan 10 *predicted sites* (Gen NA). Sebanyak 11 dari 13 *predicted sites* (85%) gen HA pada studi ini menunjukkan adanya prediksi posisi yang *overlap* dengan studi

yang dilakukan Duvvuri VR, et al.<sup>11</sup> Sedangkan hanya 4 dari 13 *predicted sites* (31%) gen HA dan 6 dari 10 *predicted sites* (60%) gen NA, *overlap* dengan studi yang dilakukan Babon JAB, et al.<sup>12</sup>

### **Pengaruh evolusi terhadap prediksi pengikatan dengan MHC kelas II**

Pada studi ini ditemukan berbagai mutasi asam amino pada eptitop di *predicted sites* gen HA dan NA. Terdapat beberapa mutasi yang terjadi pada tahun tertentu yang kemudian pada tahun selanjutnya terjadi mutasi tambahan pada posisi lainnya. Mutasi asam amino yang terakumulasi seiring waktu ini menandakan gen HA dan NA virus H3N2 di Indonesia mengalami evolusi secara *antigenic drift*.

Evolusi yang ditandai dengan mutasi asam amino ini, mengakibatkan perubahan skor antigenisitas yang mungkin disebabkan perubahan sifat asam amino seperti polar dengan nonpolar (dan sebaliknya) atau juga karena muatan elektrik masing masing asam amino. Hal ini juga didukung oleh studi oleh Doytchinova IA dan Flower DR<sup>13</sup>, yang mengatakan terdapat 3 hal yang mendeskripsikan sekuens asam amino yaitu hidrofobisitas, ukuran, dan sifat elektroniknya. Homan EJ dan Bremel RD<sup>14</sup> dalam studinya mengungkapkan bahwa prediksi afinitas

pengikatan MHC kelas II terhadap epitop dapat terjadi peningkatan maupun penurunan ketika terdapat mutasi 1 sampai 8 asam amino dalam peptida 15-mer.

Perubahan asam amino pada *predicted sites* juga mengakibatkan adanya perubahan HLA dominan bila dibandingkan dengan *ancestor*. Seperti pada kedua kluster sekuens tahun 2019 gen HA, pada epitop di *predicted sites* 151 sampai 165, terjadi perubahan HLA dominan dari HLA-DRB3\*02:02 menjadi HLA-DRB1\*07:01. Sedangkan pada kedua kluster tahun 2019 gen NA pada epitop di *predicted sites* 306 sampai 320 mengalami perubahan HLA dominan dari HLA-DRB1\*07:01 menjadi HLA-DRB1\*15:01. Walau demikian masih belum banyak jurnal mengenai HLA yang berada di Indonesia sehingga masih belum diketahui bagaimana efek perubahan HLA dominan ini di Indonesia. Hasil studi ini juga menunjukkan bahwa salah satu kluster tahun 2019 tepatnya sekuens COV18.230/2019 berkemungkinan besar akan berkembang lebih lanjut pada tahun berikutnya karena pada sekuens ini ditemukan perubahan skor antigenisitas menjadi non antigenik pada *predicted sites* gen HA 151 s/d 165 dan tidak ditemukan pada sekuens tahun 2019 lainnya. Perubahan ini menyebabkan sekuens tersebut dapat



menghindari sistem imun akibat perubahan skor yang menjadi non antigenik.

Berdasarkan hasil studi, diperoleh beberapa *predicted sites* yang mungkin dapat dijadikan epitop untuk kandidat vaksin yaitu pada gen HA predicted sites 441-455 dan 246-260, dan pada gen NA predicted sites 21-35 dikarenakan predicted-predicted sites tersebut ditemukan overlap dengan studi Duvvuri VR, et al<sup>11</sup> dan Babon JAB, et al<sup>12</sup> dan pada studi tersebut, *predicted sites* yang overlap ditemukan konserve dalam waktu lama dan menimbulkan respon IFN- $\gamma$ , yang penting untuk eliminasi virus dari tubuh.

## KESIMPULAN

Pada studi ini didapatkan beberapa kesimpulan yaitu polimorfisme gen HA dan NA menunjukkan adanya variasi genetik yang terlihat melalui pohon filogenetik HA dan NA, tidak semua mutasi basa nukleotida menyebabkan perubahan asam amino. Namun, perubahan asam amino yang terjadi dapat menyebabkan perubahan sifat polar, non-polar, dan muatan elektrik pada epitop gen HA dan NA. Evolusi pada gen HA dan NA menyebabkan peningkatan, penurunan, bahkan hilangnya kemampuan berikatan dengan MHC kelas

II dan juga menyebabkan perubahan HLA dominan. Terdapat kemungkinan kluster tahun 2019 yaitu COV18.230/2019 yang akan berkembang di tahun selanjutnya dan dapat menghindari sistem imun.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Yang H, Carney PJ, Chang JC, Guo Z, Villanueva JM, Stevens J. Structure and receptor binding preferences of recombinant human A(H3N2) virus hemagglutinins. *Virology*.2015;477:18–31.
2. Kosasih H, Roselinda, Nurhayati, Klimov A, Xiyan X, Lindstrom S, et al. Surveillance of influenza in Indonesia, 2003-2007: Influenza surveillance in Indonesia. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7(3):312–20.
3. Vemula SV, Zhao J, Liu J, Wang X, Biswas S, Hewlett I. Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans. *Viruses*.;8(4):96.
4. Shao W, Li X, Goraya MU, Wang S, Chen JL. Evolution of influenza A virus by mutation and re-assortment. *IJMS*. 2017;18(8):1650.
5. Yang J, Liu S, Du L, Jiang S. A new role of neuraminidase (NA) in the influenza virus life cycle: implication for developing NA inhibitors with novel mechanism of action. *Rev Med Virol*. 2016;26(4):242–50.
6. Major histocompatibility complex molecules and antigen presentation to T lymphocytes. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. p.107-136.
7. Finlay BB, McFadden G. Anti-Immunology: Evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*. 2006;124(4):767–82.
8. Treanor J. Influenza Vaccine — Outmaneuvering antigenic shift and drift. *NEJM*. 2004;350(3):218–20.
9. Allen JD, Ross TM. H3N2 influenza viruses in humans: viral mechanisms, evolution, and evaluation. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2018;14(8):1840–7.

10. Agustiningsih 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. Chiang T-Y, editor. PLoS ONE;13(8):e0201427.
11. Duvvuri VR, Marchand-Austin A, Eshaghi A, Patel SN, Low DE, Gubbay JB. Potential T cell epitops within swine-origin triple reassortant influenza A (H3N2) variant virus which emerged in 2011: An immunoinformatics study. Vaccine. 2012;30(42):6054–63.
12. Babon JAB, Cruz J, Orphin L, Pazoles P, Co MDT, Ennis FA, et al. Genome-wide screening of human T-cell epitops in influenza A virus reveals a broad spectrum of CD4+ T-cell responses to internal proteins, hemagglutinins, and neuraminidases. Human Immunology. 2009;70(9):711–21
13. Homan EJ, Bremel RD. Patterns of predicted T-cell epitops associated with antigenic drift in influenza H3N2 hemagglutinin. PLoS ONE. 2011;6(10):e26711.
14. Doytchinova IA, Flower DR. Identifying candidate subunit vaccines using an alignment-independent method based on principal amino acid properties. Vaccine. 2007;25(5):856-66.