

## **Efikasi, Mekanisme dan Resistensi Antiviral *Neuraminidase Inhibitor* dan Adamantane pada Avian Influenza**

### **(Efficacy, Mechanism and Antiviral Resistance of *Neuraminidase Inhibitors* and Adamantane against Avian Influenza)**

Dyah Ayu Hewajuli dan NLP Indi Dharmayanti

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114  
Kontributor utama: [dhewajuli@yahoo.com](mailto:dhewajuli@yahoo.com)

(Diterima 22 Februari 2019 – Direvisi 29 April 2019 – Disetujui 4 Juni 2019)

#### **ABSTRACT**

Vaccination and antiviral drug are often used to control influenza. However, the effectiveness of vaccine was impaired due to the emergence of new variant of virus strain. Antiviral drug consists of prophylactic and curative substances, namely M2 ion channel inhibitors (adamantane; amantadine and rimantadine) and neuraminidase (NA) inhibitors (NAIs; oseltamivir, zanamivir, peramivir, laninamivir). The synthesis and modification of antiviral neuraminidase (NA) inhibitors (NAIs) and adamantanes increased the antiviral effectiveness. The mechanism of the neuraminidase inhibitor is to prevent influenza infection by inhibiting the release of the virus from internal cells. Adamantane is antiviral drug that selectively inhibits the flow of H<sup>+</sup> ions through M2 protein to prevent the uncoating virus particles getting into the endosome. The substitution of (H275Y, S247N, I223L, K150N, R292K, I222T, R152K, R118K, E119V) on NA protein caused resistance of avian influenza virus against the neuraminidase inhibitor. The combination of mutations (S247N, I223L, K150N) increased the resistance of influenza A (H5N1) virus. The diffusion of adamantane resistance varies among HA subtypes, the species of host, the period of isolation, and region. Mutations at residues of 26, 27, 30, 31 or 34 transmembrane M2 protein caused adamantane resistance. The unique substitution (V27I) of M2 protein of clade 2.3.2 H5N1 subtype isolated in Indonesia in 2016 has been contributed to the amantadine resistance. Antiviral combination of M2 ion channel inhibitors and neuraminidase (NA) inhibitors is effective treatments for the resistance.

**Key words:** Adamantane, neuraminidase inhibitor, resistance, avian influenza

#### **ABSTRAK**

Vaksinasi dan pengobatan dengan antiviral merupakan pengendalian untuk mengatasi influenza. Kegagalan efektivitas vaksin sering terjadi karena munculnya varian *strain* virus. Terdapat dua jenis obat antiviral yaitu profilaktik dan kuratif yaitu *M2 ion channel inhibitors* (adamantane; amantadin dan rimantadin) dan *neuraminidase (NA) inhibitors* (NAIs; oseltamivir, zanamivir, peramivir, laninamivir). Sintesis dan modifikasi *neuraminidase (NA) inhibitors* (NAIs) dapat meningkatkan efikasi antiviralnya. Mekanisme *inhibitor* neuraminidase adalah mencegah infeksi dengan cara menghambat pelepasan virus dari sel inang. Adamantane merupakan obat antiviral yang menghambat secara selektif aliran ion H<sup>+</sup> yang melalui saluran protein M2 sehingga mencegah partikel virus *uncoating* masuk ke dalam endosom. Substitusi H275Y, S247N, I223L, K150N, R292K, I222T, R152K, R118K, E119V pada protein NA menyebabkan resistensi virus avian influenza terhadap *neuraminidase inhibitor*. Kombinasi mutasi (S247N, I223L, K150N) meningkatkan resistensi virus influenza A (H5N1). Penyebaran resistensi adamantane dilaporkan bervariasi diantara sub tipe HA, spesies inang, periode isolasi, dan wilayah. Mutasi pada residu 26, 27, 30, 31 atau 34 protein M2 domain transmembran menyebabkan resistensi adamantane. Substitusi unik (V27I) pada protein M2 sub tipe H5N1 clade 2.3.2 yang diisolasi di Indonesia pada tahun 2016 berkontribusi terhadap resistensi amantadin. Kombinasi antiviral (*M2 ion channel inhibitors* dan *neuraminidase inhibitors* bersifat efektif untuk pengobatan influenza A yang telah resisten terhadap *neuraminidase inhibitor*.

**Kata kunci:** Adamantane, *neuraminidase inhibitor*, resistensi, avian influenza

#### **PENDAHULUAN**

Vaksinasi dan pengobatan dengan antiviral merupakan strategi yang sering digunakan untuk mengatasi penyakit influenza (Lee et al. 2015). Vaksinasi adalah program utama untuk pencegahan dan pengendalian epidemik influenza musiman. Selain itu,

terdapat dua kelas obat antiviral yang direkomendasikan untuk profilaktik dan pengobatan infeksi virus influenza yaitu *M2 ion channel inhibitors* (adamantane; amantadin dan rimantadin) dan *neuraminidase (NA) inhibitors* (NAIs; oseltamivir, zanamivir, peramivir, laninamivir). Namun demikian, resistensi virus influenza terhadap obat antiviral *M2 ion*

*channel inhibitors* dan *neuraminidase (NA) inhibitors* telah banyak dilaporkan akhir-akhir ini. Jumlah dan penyebaran virus influenza yang resisten terhadap adamantane bervariasi diantara sub tipe HA yang berbeda, spesies inang, tahun isolasi, dan wilayah geografis (Dong et al. 2015). Proses *shedding* virus AI yang berlangsung lama menyebabkan penularan virus AI yang resisten terhadap antiviral NAI kepada individu lainnya. Varian virus AI yang resisten terhadap obat antiviral dapat bereplikasi secara efisien dan dapat ditularkan dari satu individu ke individu lainnya tanpa menurunkan patogenitasnya. Resistensi virus AI terhadap obat antiviral NAI disebabkan oleh penggunaan antiviral secara terus menerus (Hu et al. 2013).

Pengobatan infeksi virus AI yang bertujuan untuk profilaksis di peternakan unggas secara intensif di beberapa wilayah di Cina berkontribusi terhadap peningkatan resistensi virus AI sub tipe H5N1 terhadap amantadin sampai 83,3 % (He et al. 2008). Virus AI sub tipe H5N1 yang mengalami mutasi dan resisten amantadin kemungkinan merupakan introduksi dari luar (Dharmayanti et al. 2014). Resistensi virus AI terhadap obat antiviral dapat disebabkan oleh mutasi virus pada protein M2 dan NA. Substitusi R299K pada protein NA yang diperoleh dari rekombinasi strain virus AI menimbulkan resistensi virus AI terhadap antiviral golongan NAIs tetapi tidak menyebabkan resistensi terhadap obat antiviral golongan *M2 ion channel inhibitor* (M2I) (Zhang et al. 2014).

Substitusi asam amino (I222K, I222R, I222T) protein NA menyebabkan penurunan sensitivitas virus AI terhadap antiviral golongan NAIs. Lebih lanjut, mutasi ganda I222K dan H274Y menyebabkan resistensi virus AI terhadap oseltamivir (NAIs) (Huang et al. 2014). Perubahan asam amino pada domain transmembran protein M2 (L26F, V27A, V27T, V27S, A30T, S31N, G34E) merupakan *marker* genetik resistensi amantadin. Sebagian besar virus influenza yang resisten terhadap amantadin dapat mempunyai satu atau lebih perubahan asam amino tersebut (Dharmayanti et al. 2010). Mutasi ganda V27A dan S31N dapat meningkatkan kadar resistensi virus AI terhadap amantadin (Durrant et al. 2015). Substitusi asam amino V27I pada domain transmembran protein M2 virus HPAI *clade* 2.3.2 asal Indonesia berperan terhadap resistensi amantadin (Hewajuli 2017). Mutasi

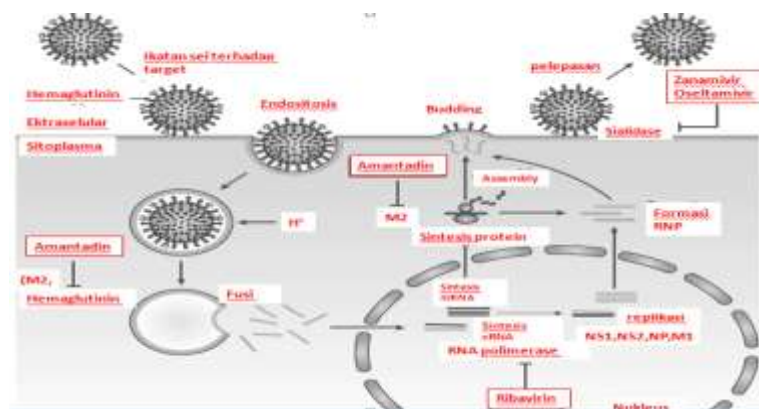
tunggal V27I atau ganda (V27I dan L26F) pada virus AI asal unggas dan manusia kemungkinan berpengaruh terhadap resistensi amantadin (Liang et al. 2016a).

Resistensi virus AI terhadap antiviral yang disebabkan mutasi pada protein M2 dan NA harus diperhatikan dan diwaspadai (Dong et al. 2015). Oleh karena itu, pengembangan kombinasi obat anti influenza sangat diperlukan dalam menghadapi epidemi influenza yang kemungkinan bisa terjadi di masa datang. Pengobatan dengan kombinasi antiviral *M2 ion channel inhibitor* (adamantadane) dan NAIs dipakai untuk menekan penyebaran resistensi virus AI terhadap antiviral. Tiga kombinasi antiviral amantadin, oseltamivir dan ribavirin efektif untuk terapi HPAI yang masih sensitif atau sudah resisten terhadap antiviral amantadin (Nguyen et al. 2012). Bahkan, efikasi tiga kombinasi tersebut lebih tinggi daripada pengobatan tunggal atau dua kombinasi antiviral (Hoopes et al. 2011).

Makalah ini bertujuan untuk mengkaji efikasi dan mekanisme obat antiviral golongan *M2 ion channel inhibitors* (adamantadane) dan NAIs untuk AI serta resistensi virus AI terhadap kedua golongan obat tersebut.

## INFEKSI VIRUS AVIAN INFLUENZA PADA SEL INANG

Virus influenza menginfeksi sel epitel saluran pernafasan, meskipun demikian sel kekebalan seperti makrofag pada saluran pernafasan dan dendritik juga peka terhadap infeksi virus influenza (Short et al. 2012). Infeksi virus influenza pada sel diawali dengan tahap penempelan (*attachment*) glikoprotein HA virus pada asam sialat yang diekspresikan oleh glikoprotein dan glikolipid pada permukaan sel target. Mutasi pada protein HA dapat mengganggu stabilitas dan meningkatkan pH pada waktu fusi. Stabilitas dan aktivitas fusi HA berpengaruh terhadap penularan virus avian influenza H1N1 ke babi. Karakter fusi protein HA yang spesifik pada inang kemungkinan menjadi barrier penularan virus influenza dari unggas ke babi dan dari babi ke manusia (Baumann et al. 2016). Mekanisme infeksi virus influenza ke dalam sel dan target terapi ditunjukkan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Siklus hidup virus influenza dan target terapi

**Sumber:** Adaptasi dari Von Itzstein (2007)

Virus memasuki sel (*internalization*) melalui endositosis yang diperantarai reseptor (*receptor-mediated endocytosis*). Reseptor bersifat spesifik, tetapi identifikasi terhadap reseptor spesifik belum banyak dilaporkan (De Conto et al. 2011). Reseptor atau ligan virus influenza adalah *sialic acid-galactose* (*Sia-Gal*) atau asam sialat-galaktosa, terdiri dari asam sialat-galaktosa  $\alpha$  2,3 dan asam sialat-galaktosa  $\alpha$  2,6. Asam sialat-galaktosa  $\alpha$  2,3 lebih spesifik berikatan dengan virus influenza unggas tetapi asam sialat-galaktosa  $\alpha$  2,6 lebih spesifik berikatan dengan virus influenza manusia (Matrosovich et al. 1997). Reseptor asam sialat-galaktosa  $\alpha$  2,3 dan  $\alpha$  2,6 dapat dideteksi di saluran pernafasan (paru-paru dan bronkus) manusia. Unggas mempunyai reseptor asam sialat-galaktosa  $\alpha$  2,3 dan  $\alpha$  2,6 pada saluran pernafasan dan saluran pencernaan meskipun terdapat perbedaan jumlah diantara spesies. Spesifisitas reseptor asam sialat berpengaruh terhadap kerentanan infeksi dan *shedding* virus (Franca et al. 2013). Residu asam amino 158N dan 169N pada protein HA juga berperan sebagai reseptor virus avian influenza (Chen et al. 2012). Jumlah dan struktur N-glikan pada *receptor binding pocket* menentukan jenis inang dan patogenitas virus influenza (Wagner et al. 2000).

Faktor lain yang menentukan prevalensi, *shedding*, gejala penyakit yang ditimbulkan infeksi virus HPAI adalah inang dan *strain* virus (Franca et al. 2013). Virus AI yang bermutasi pada protein HA yang disebabkan adaptasi dengan mamalia berpotensi menular ke mamalia (Belser et al. 2018). Komposisi *receptor binding site* menentukan kemampuan prevalensi virus AI. Virus AI yang menyebabkan pandemik influenza mempunyai aviditas yang tinggi terhadap *human receptor* sehingga kemungkinan berpotensi menginfeksi manusia. Mutasi pada protein HA dari *avian receptor* menjadi *human receptor* akan menurunkan aviditasnya untuk berikatan dengan *avian receptor* (Vachieri et al. 2014). Meskipun demikian,

virus AI yang masih mengenal *avian receptor binding* beresiko rendah untuk menular ke manusia (Yang et al. 2015).

Virus AI yang sudah berikatan dengan reseptor akan melakukan fusi dengan membran sel endosom/endositosis. Endositosis pada sel dengan kondisi *non polar* dapat terjadi melalui *classical clathrin-mediated endocytic* (CME), *clathrin and caveolae-independent* dan *macropinocytosis* tetapi endositosis pada kondisi polar hanya dapat dilalui melalui *clathrin-mediated endocytic* serta memerlukan protein Eps15. Protein tersebut merupakan adaptor yang berinteraksi dengan Epsin1, AP180, dan *synaptojanin* melalui domain *Eps homology* (EH) dan membawa protein adaptor AP-2 menuju membran plasma (Zhang & Whittaker 2014). Internalisasi virus ke sel inang diperantarai oleh *coreceptor*. DC-SIGN dan L-SIGN adalah *CLR mannose-specific* merupakan faktor perekat yang mempengaruhi berbagai virus yang berbeda. Mutasi AA dan DEL dari DC-SIGN / L-SIGN tidak berpengaruh terhadap kemampuan pengikatan virus AI tetapi menurunkan kemampuan endositosis (Gillespie et al. 2016)

Proses endositosis dipengaruhi oleh pH. Kondisi endosom dengan pH 6 - 6,5 serta konsentrasi  $\text{Na}^+$  tinggi dan  $\text{K}^+$  rendah dapat mengaktifkan M2 *ion channel*, menyebabkan aliran proton dan  $\text{K}^+$  dari partikel virus. M2 *ion channel* virus berperan dalam pengasaman partikel virus sehingga terjadi proses depolimerisasi protein M1 yang menyebabkan disosiasi protein M1 dari *viral ribonucleoprotein* (vRNPs). Endosom yang sudah matang mempunyai pH 5,4 - 6 serta konsentrasi  $\text{Na}^+$  rendah dan  $\text{K}^+$  tinggi kemudian  $\text{K}^+$  mengalir melalui M2 *ion channel*. Konsentrasi  $\text{K}^+$  tinggi dan pH rendah menyebabkan disosiasi protein M1 dari amplop virus dan *viral ribonucleoprotein* (vRNPs) (Stauffer et al. 2014).

Partikel vRNP dilepas ke nukleus dan terjadi transkripsi dan translasi. Replikasi genom virus dimulai

dengan sintesis mRNA ditranslasi menjadi beberapa protein. Perakitan virion terjadi pada permukaan sel kemudian terjadi pelepasan virion. Semua protein HA, NA, M2 dan M1 menyebabkan pelepasan *virus like particle* (VLP). Diantara beberapa protein virus, protein HA dan NA berperan pada awal terjadinya proses pelepasan partikel virus (Wang et al. 2010).

Protein HA dan NA mampu mengubah elastisitas membran. Kandungan lemak dalam protein HA dan NA berfungsi untuk mempengaruhi elastisitas membran yang akan mengawali proses pelepasan virus (Wang et al. 2010). Fungsi protein NA secara spesifik adalah memecah asam sialat, mencegah penempelan kembali virion pada sel membran serta mendorong pelepasan virion baru (Boulo et al. 2007). Virion progeni dilepaskan dengan mengkatalisis pembelahan residu terminal asam sialat dari protein seluler dan virus yang diperankan oleh protein NA sebagai enzim yang berfungsi sebagai sialidase yaitu enzim yang memecah reseptor. *N-Acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminic acid* (Neu2enAc) dalam musin menunjukkan bahwa inang menghambat NA. Molekul Neu2enAc dihasilkan oleh aktivitas sialidase dalam saliva (Cohen et al. 2013).

### PROTEIN NEURAMINIDASE DAN M2 PROTON CHANNEL

Protein neuraminidase virus influenza A adalah reseptor penghancur enzim yang berfungsi membelah asam sialat glikoprotein seluler yang diekspresikan dalam sel yang terinfeksi dan glikoprotein virus yang dirakit menjadi virion. Hal ini akan mencegah HA menempel pada partikel virus yang baru muncul di permukaan sel dan terjadi pelepasan virus (Palese et al. 1974). Struktur kompleks NA dengan 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetyl *neuraminic acid* (DANA) dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkaraktirasi bagian katalisis enzim. Domain tangkai bersifat variabel, berperan dalam adaptasi virus avian influenza dari unggas air ke unggas. Mutasi delesi asam amino pada bagian tangkai protein NA berpengaruh terhadap efisiensi replikasi virus AI (Li et al. 2010).

Asam sialat (Sia) sekunder dari bagian pengikat asam sialat hanya ditemukan di beberapa strain virus AI. Protein NA dari subtipe tertentu virus AI seperti N9 mempunyai situs asam sialat sekunder dan situs *hemadsorption* (Hb) yang berperan sebagai perantara ikatan terhadap asam sialat. Protein NA dari virus subtipe N9 yang mempunyai situs Hb aktif dapat meningkatkan ikatan terhadap reseptor asam sialat  $\alpha$ 2,6 di manusia sehingga kemungkinan dapat mempermudah penularan virus AI antar manusia (Benton et al. 2017).

Filamen virus AI berperan terhadap infeksi virus pada sel inang. Partikel virus AI yang berbentuk filamen mempunyai luas permukaan lebih besar daripada bentuk spiral. Strain virus yang berbentuk filamen akan berbuah secara gradual menjadi bentuk spiral apabila strain tersebut mengalami pasase berulang-ulang di telur ayam berembrio (Seladi-Schulman et al. 2013). Morfologi partikel virus AI berpengaruh terhadap aktivitas glikoprotein NA. Aktivitas NA yang lebih besar dapat meningkatkan kemampuan pelepasan virus AI dari sel yang terinfeksi kemudian menyebar ke sel target yang baru di saluran pernafasan (Seladi-Schulman et al. 2014).

Selain protein NA, protein M juga berfungsi terhadap penyebaran virus AI. Protein M2 influenza A adalah saluran ion proton yang membentuk proton tetramer selektif dan dipengaruhi pH. Kestabilan pembukaan dan penutupan saluran dipengaruhi oleh potensi membran, pH, ligan, aktivitas kinetik dan termodinamik, dan suhu (Gu et al. 2011). Virus dalam endosom dengan pH rendah akan mengaktifkan M2 ion channel sehingga proton mengalir ke dalam interior virus avian influenza (Thomaston et al. 2015).

Protein M2 terdiri dari 96 residu yang akan membentuk struktur *homotetrameric*. Struktur domain protein M2 virus avian influenza terdiri dari *extodomain* (ED), *transmembrane domain* (TMD) dan *C-terminal domain* (CTD) yang terdiri dari *amphiphatic helix* (APH) dan *cytoplasmic tail* (CT). Residu asam amino 45 - 62 pada CTD membentuk APH dan CT disusun oleh residu asam amino 63 - 97 (Thaa et al. 2011). M2 memiliki heliks transmembran tunggal yang tetramer untuk membentuk pori-pori konduksi. His37 terletak di dekat pusat heliks transmembran M2 yang berfungsi sebagai pH sensor yang mengaktifkan saluran dengan menurunkan pH mendekati 6,0. Trp41 yang terletak disamping His37 sebelum C terminal dan interior virus berfungsi sebagai pintu yang tergantung pH untuk konduksi proton (Hu et al. 2012).

*Strain* virus yang mampu mempertahankan anion halida di luar pori dapat mempertahankan tingkat konduksi proton yang stabil tanpa dipengaruhi massa konsentrasi anion (Dong et al. 2014). Semua tahap perpindahan proton dalam difusi proton terjadi melalui saluran M2 influenza A, termasuk protonasi atau deprotonasi His37. Kadar pH yang diturunkan secara bertahap membuka pintu Trp41 dan menurunkan deprotonasi penyaring His37 sehingga menyebabkan aktivasi saluran. Namun demikian, helik *amphipatic* pada C terminal tidak berpengaruh secara signifikan terhadap mekanisme konduksi proton pada saluran transmembran M2 influenza A tetapi 4 helik yang mengapit saluran transmembran M2 influenza A menentukan mekanisme konduksi proton (Liang et al. 2016b).

## OBAT ANTIVIRAL GOLONGAN NEURAMINIDASE INHIBITOR

Beberapa jenis antiviral untuk pengobatan infeksi influenza telah tersedia di berbagai negara. Obat antiviral dibedakan menjadi dua golongan yaitu *Neuraminidase inhibitor* (NAI) dan *M2 ion channel inhibitors*. Golongan *neuraminidase inhibitor* terdiri dari oseltamivir, zanamivir dan peramivir. Obat antiviral amantadin dan rimantadin termasuk golongan *M2 ion channel inhibitors*. Obat klinik yang berfungsi melawan infeksi virus influenza adalah NA inhibitor influenza, *M2 ion channel inhibitor*, *RNA-dependent RNA polymerase inhibitor* dan *protease inhibitor*.

Obat antiviral golongan *neuraminidase inhibitor* seperti zanamivir, laninamivir, oseltamivir dan peramivir tersedia secara komersial dan telah direkomendasikan untuk pengobatan dan profilaksis infeksi virus influenza. Mekanisme obat ini adalah mencegah infeksi influenza dengan menghambat pelepasan virus dari sel inang (Russell et al. 2006). Golongan antiviral *neuraminidase inhibitor* yang digunakan untuk pengobatan dan profilaksis avian influenza ditunjukkan pada Tabel 1.

Tamiflu® (oseltamivir phosphate, 1) merupakan obat antiviral *neuraminidase inhibitor* yang biasanya diberikan secara per oral untuk pengobatan dan profilaksis influenza H5N1. Tamiflu® (oseltamivir

phosphate, 1) harus diberikan kepada pasien influenza selambat-lambatnya 36-48 jam setelah timbulnya gejala klinis dengan dosis 150 mg per hari. Derivat oseltamivir phosphonate bersifat lebih efektif melawan infeksi virus H1N1 dan H5N1 dibandingkan derivat oseltamivir. Sintesis tamiflu melalui pendekatan semisintetik dimulai dari (-) - asam shikimic, tetapi belum memenuhi kebutuhan pasar. Hasil sintesis sekitar 5-57% tergantung pada jumlah tahap dalam sintesis dan bahan dasar yang digunakan (Kalashnikov et al. 2013).

Obat antiviral golongan *neuraminidase inhibitor* yang bersifat sialidase, *4-guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid (4-guanidino-Neu5Ac2en)* mampu menghambat pertumbuhan virus influenza A dan B yang bersifat sialidase dibandingkan dengan amantadin, rimantadin, dan ribavirin (Woods et al. 1993). Munculnya subtipe H5N1 virus avian influenza (AIV) yang sangat patogenik dan tipe baru dari influenza manusia A (H1N1) menjadi pertimbangan untuk pengembangan obat anti-influenza yang lebih efektif untuk melawan virus yang telah resisten, yaitu *3-(p-tolyl) allyl-Neu5Ac2en* yang efektif menghambat infeksi virus influenza sialidase. Obat antiviral *3-(p-tolyl) allyl-Neu5Ac2en* mencegah ikatan dengan bagian aktif NA grup 1 yang telah resisten terhadap oseltamivir serta NA virus pandemik H1N1 2009 (09N1) (Rudrawar et al. 2010).

**Tabel 1.** Obat antiviral golongan *neuraminidase inhibitor* yang digunakan untuk pengobatan dan profilaksis avian influenza

Antiviral	Nama kode	Nama kimia	Nama dagang	Cara pemberian
Oseltamivir	GS4104	<i>ethyl(3R,4R,5S)-4-acetamido-5-amino-3-pentan-3-yloxycyclohexene-1-carboxylate;phosphoric acid</i>	Tamiflu <sup>R</sup>	Oral
Zanamivir	139110-80-8	<i>2R,3R,4S)-3-acetamido-4-(guanidino)-2-[(1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl]-3,4-dihydro-2H-pyran-6-carboxylic acid</i>	Relenza <sup>R</sup>	Oral Inhalasi
Peramivir	BCX-1812 dan RWJ-270201	<i>(1S,2S,3S,4R)-3-[(1S)-1-acetamido-2-ethylbutyl]-4-(diaminomethylideneamino)-2-hydroxycyclopentane-1-carboxylic acid</i>	Rapivab <sup>R</sup>	Intravena
Laninamivir	R-125489	<i>2R,3R,4S)-3-acetamido-4-(guanidino)-2-[(1R,2R)-2,3-dihydroxy-1-methoxypropyl]-3,4-dihydro-2H-pyran-6-carboxylic acid</i>	Inavir <sup>R</sup>	Oral Inhalasi

**Sumber:** Kim et al. (1997); Von Itzstein et al. (1993); Babu et al. (2000); Yamashita et al. (2009)

Zanamivir disintesis pertama kali menggunakan asam sialat Neu5Ac. Awalnya Neu5Ac dikonversi menjadi etilester, yang diberi perlakuan asam anhidrid dalam asam asetat yang mengandung asam sulfur. Selain itu, zanamivir juga disintesis dengan bahan lain seperti *D-glucono- lactone*, *(E)-4-methoxybenzyloxy-2-butanol*. Dua turunan *C4-thiocarbamido* dapat disintesis dari zanamivir dengan metode ini (Zhu et al. 2012). Laninamivir (R-125489) adalah antiviral golongan *neuraminidase inhibitor* yang efektif untuk mengobati infeksi berbagai influenza. Struktur kimianya adalah *(2R, 3R, 4S) -3-acetamido-2 - ((1R, 2R) -2,3-dihidroksi-1-methoxypropyl] -4-guanidino-3,4-dihydro-2Hpyran-6-carboxylic acid)*. Bentuk esterifikasi laninamivir (3- (O) -octanoyl laninamivir, R-125489-C8 (CS-8958) lebih efektif untuk pengobatan infeksi virus influenza A dan B serta virus yang resisten oseltamivir dibandingkan bentuk laninamivir lainnya (Yamashita et al. 2009).

Senyawa CS-8958 (Laninamivir) bersifat efektif terhadap virus influenza H5N1, bahkan virus yang resisten oseltamivir secara *in vitro* dan *in vivo*. Senyawa CS-8958 menghambat aktivitas protein NA virus influenza H5N1 baik yang sensitif maupun resisten oseltamivir secara *in vitro*. Senyawa R-125489-C8 (CS-8958) atau laninamivir mempunyai daya ikat yang lebih kuat terhadap NA dibandingkan peramivir. Replikasi virus H5N1 di otak tikus dapat dihambat oleh senyawa CS-8958. Senyawa CS-8958 (laninamivir) dapat digunakan sebagai profilaksis infeksi virus influenza H5N1 (Kiso et al. 2010).

Pengobatan infeksi virus influenza A dan B dengan CS-8958 memerlukan dosis tunggal sebesar 20-40 mg melalui inhalasi oral dengan menggunakan *dry powder inhaler*. Pemberian CS-8958 dengan dosis 40 mg dapat menurunkan *shedding* virus pada hari ke 3 pasca pengobatan dan gejala demam setelah 21,5 jam pengobatan (Watanabe et al. 2010). Senyawa obat antiviral lain memerlukan 75 mg 2 kali sehari selama 5 hari melalui aplikasi oral. Konsentrasi laninamivir ditemukan dalam plasma dan urin selama 144 jam atau kurang lebih 3 hari setelah pemberian tetapi waktu paruh CS-8958 dalam plasma sekitar 2 jam (Ishizuka et al. 2010). Hal ini menunjukkan bahwa CS-8958 yang diberikan secara inhalasi berpotensi menjadi alternatif lain untuk pengobatan influenza karena mempunyai masa kerja yang lama (Ishizuka et al. 2010).

Pengobatan infeksi influenza dengan antiviral peramivir yang diberikan melalui intravena atau intramuskular dapat menjadi alternatif pemberian bagi pasien yang tidak dapat diberi pengobatan zanamivir (inhalasi) dan oseltamivir (oral). Pemberian peramivir dengan dosis tunggal maupun ganda bersifat efektif untuk pengobatan infeksi virus avian influenza H1N1 yang resisten terhadap oseltamivir yang mengalami mutasi H275Y pada protein NA (Abed et al. 2012).

Lembaga *Food and Drug Administration* (FDA) merekomendasikan 3 jenis antiviral (*Neuraminidase*) yaitu oseltamivir (Tamiflu), Zanamivir (Relenza) dan peramivir (Rapivab) untuk penanganan infeksi influenza A dan B selama tahun 2017-2018 di Amerika. Pengobatan antiviral oseltamivir, zanamivir dan peramivir diberikan pada awal gejala klinis sampai 3-5 hari, sedangkan untuk profilaksis diberikan selama 7 hari tetapi tidak dianjurkan apabila infeksi terjadi lebih dari 48 jam (CDC 2018).

Pemberian obat antiviral dengan tujuan profilaksis dapat meningkatkan efektivitas vaksinasi karena obat antiviral efektif mencegah infeksi influenza sekitar 70-90%. Namun demikian, pemakaian obat antiviral secara rutin untuk tujuan profilaksis tidak dianjurkan karena dapat meningkatkan resistensi virus influenza terhadap antiviral (CDC 2018).

### RESISTENSI ANTIVIRAL GOLONGAN *NEURAMINIDASE INHIBITOR*

Sebagian besar resistensi virus influenza terhadap oseltamivir berkaitan dengan substitusi protein NA. Sebagian besar virus influenza A (H1N1 pdm09, H3N2) dan virus influenza yang bersirkulasi di Jepang masih sensitif terhadap antiviral golongan NAI kecuali oseltamivir. Virus influenza A (H1N1) pdm09 mempunyai sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan virus influenza yang diisolasi tahun 2010-2011. Virus influenza A (H3N2) lebih sensitif terhadap NAI dibandingkan dengan virus yang diisolasi tahun 2012-2013. Sensitivitas virus influenza B lebih tinggi dibandingkan dengan virus yang diisolasi tahun 2012-2013. Sebagian besar virus tersebut sudah tidak sensitif terhadap oseltamivir (Ikematsu et al. 2015).

Semua virus H3N2 dan H1N1 yang ditemukan di Lebanon tahun 2010-2011 telah resisten terhadap amantadin tetapi virus tersebut sensitif terhadap antiviral golongan *neuraminidase inhibitor* (oseltamivir, zanamivir, peramivir, laninamivir). Namun demikian, virus yang bersirkulasi tahun 2011-2012 telah mengalami mutasi H275Y pada protein NA yang menyebabkan virus resisten terhadap oseltamivir. Sensitivitas terhadap oseltamivir berkurang menjadi 4 kali lipat pada virus yang mengalami mutasi H275Y (Zaraket et al. 2014). Mutasi H275Y pada protein NA virus influenza A (H1N1) pdm09 ditemukan di wilayah New South Wales dan Australia Barat. *Strain* virus yang telah resisten terhadap oseltamivir di daerah tersebut mempunyai genetik yang mirip sehingga kemungkinan resistensi virus berasal dari sumber virus yang sama (Hurt et al. 2012).

Virus H1N1 dengan mutasi H275Y menunjukkan reaksi antibodi yang lemah terhadap antigen virus H1N1 sehingga virus dengan residu 275Y bersifat kurang imunogenik dibandingkan dari virus dengan

residu 275H pada protein NA. Virus yang resisten terhadap oseltamivir mempunyai kemampuan menghindari dari sistem kekebalan dan bersifat toleran terhadap netralisasi antibodi (Wu et al. 2012). Respon antibodi terhadap virus yang resisten oseltamivir mulai terbentuk pada hari ke-21 setelah munculnya gejala klinis (Lin et al. 2014). Penggunaan antiviral *neuraminidase inhibitor* untuk pengobatan infeksi influenza yang semakin meningkat dari tahun ke tahun menyebabkan virus H1N1 pdm09 resisten terhadap oseltamivir (Wu et al. 2012).

Sebagian besar sekuen virus H1N1 pdm09 yang tersedia di GISAID mempunyai residu H275Y pada protein NA yang mengindikasikan virus H1N1 pdm09 yang bersirkulasi saat ini lebih resisten terhadap oseltamivir dibandingkan dengan virus H1N1 pdm09 yang diisolasi pertama kali pada tahun 2009 (Hurt et al. 2012). Selain mutasi H275Y, mutasi S247N yang menyebabkan resistensi oseltamivir atau zanamivir juga ditemukan pada protein NA virus H1N1 pdm09 di Australia dan Asia Pasifik. Mutasi ganda H275Y dan S247N pada H1N1pdm 09 dapat meningkatkan kadar resistensinya terhadap oseltamivir. Virus yang mempunyai mutasi ganda (H275Y dan S247N) memerlukan konsentrasi 6000 kali lebih tinggi dibandingkan dengan virus yang tidak bermutasi dan 10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan virus yang mengalami mutasi tunggal (H275Y). Kombinasi mutasi (S247N, I223L, K150N) juga dikarakterisasi pada virus influenza A (H5N1). Triple mutasi ini dapat meningkatkan resistensi virus terhadap amantadine sebesar 77 kali lipat (Hurt et al. 2011).

Virus avian influenza sub tipe H6N2 yang menginfeksi unggas air bersifat resisten terhadap pengobatan oseltamivir 12 ug/L. Substitusi R292K pada protein NA dari virus tersebut berperan terhadap resistensi oseltamivir. Virus H6N2 yang resisten terhadap oseltamivir dapat ditularkan antar unggas air tanpa mengubah sifat dari virus tersebut. Virus yang mengalami substitusi R292K akan berkompetisi dengan virus yang tidak bermutasi dalam tubuh unggas sehingga substitusi R292K tidak ditemukan lagi dalam tubuh unggas (Gillman et al. 2015a). Tekanan evolusi lingkungan mempengaruhi peningkatan resistensi virus avian influenza terhadap oseltamivir karena sebagian besar metabolit oseltamivir *carboxylate* (OC) yang tidak terdegradasi pada waktu pengolahan limbah kemudian mengalir ke sungai yang merupakan tempat tinggal unggas air. Paparan oseltamivir dengan dosis rendah secara terus menerus melalui air minum pada unggas air yang diinfeksi virus avian influenza H7N9 menyebabkan virus bermutasi (I222T) pada protein NA yang berkontribusi terhadap resistensi oseltamivir dan

zanamivir. Dosis yang diperlukan untuk pengobatan infeksi virus resisten meningkat 8 kali lipat (oseltamivir) dan 2,5 kali lipat (zanamivir) (Gillman et al. 2015b).

Residu obat antiviral baru seperti peramivir dan laninamivir juga dideteksi pada air pengolahan limbah dan air sungai dengan kadar yang cukup tinggi. Konsentrasi peramivir 64 (air pengolahan limbah) dan 11 ng/L (air sungai), laninamivir 21 (air pengolahan limbah) dan 9 ng/L (air sungai). Perlakuan ozonisasi pada waktu proses pengolahan air limbah tidak mampu mendegradasi zat aktif dari antiviral tersebut sehingga resiko kontaminasi antiviral tersebut di lingkungan air sangat tinggi. Air lingkungan yang terkontaminasi antiviral berpotensi meningkatkan resistensi antiviral di unggas air liar (Azuma et al. 2015).

Mutasi R152K dan R118K pada protein NA virus avian influenza sub tipe N6 dan N9 yang diisolasi dari unggas air menyebabkan resistensi terhadap zanamivir. Mutasi E119V NA berperan terhadap peningkatan resistensi oseltamivir pada manusia dan unggas air. Namun demikian, mutasi E119V NA tidak menyebabkan resistensi oseltamivir yang permanen di unggas. Pemberian oseltamivir pada unggas memicu stabilitas mutasi virus avian influenza. Unggas air merupakan inang *reservoir* dari semua sub tipe virus avian influenza sehingga unggas air berkontribusi menularkan virus tersebut termasuk virus yang resisten oseltamivir ke spesies lain seperti manusia (Achenbach & Bowen 2013).

## ANTIVIRAL GOLONGAN ADAMANTASE

Mekanisme kerja adamantane adalah memblokir aliran ion H<sup>+</sup> yang melalui saluran protein M2 menuju ke bagian dalam partikel virus sehingga mencegah *uncoating* partikel virus influenza ke dalam endosom (Liang et al. 2014). Amantadin dan rimantadin dapat digunakan sebagai obat antiviral alternatif yang lebih murah dibandingkan golongan neuraminidase inhibitor (Tabel 2). Pencegahan dan pengobatan alternatif dengan amantadin dan rimantadin bersifat efektif apabila virus influenza yang bersirkulasi masih sensitif terhadap obat antiviral M2 *inhibitor* (Alves Galvao et al. 2014).

Amantadine digunakan dalam bentuk garam amantadine hidroklorida (AMA-HCl) dengan nama dagang Virosol, Virofral, Symadine atau Symmetrel. Nama-nama dagang antiviral tersebut digunakan untuk pengobatan pada manusia di Eropa dan di Amerika Serikat lebih dari 30 tahun yang lalu (Douglas 1990).

**Tabel 2.** Obat antiviral golongan Adamantane yang digunakan untuk pengobatan dan profilaksis avian influenza

Golongan obat antiviral	Nama obat	Singkatan	Nama dagang	Penggunaan klinik	Mekanisme kerja obat	Tahun Rekomendasi
Adamantane	Amantadine	AMT	Symmetrel	Influenza virus A	Target protein M2 virus untuk menghambat <i>uncoupling</i> virus	1966
	Rimantadine	RIM	Humadine	Influenza virus A	Target protein M2 virus untuk menghambat <i>uncoupling</i> virus	1993

**Sumber:** Douglas 1990; Wright et al. 2016

Beberapa metode sintesis amantadine hidroklorida telah dilakukan dengan hasil persentase rata-rata 45-58%. Sintesis ini dimulai dari adamantane yang menggunakan 4 tahapan prosedur untuk menghasilkan amantadine hidroklorida. Sintesis amantadine hidroklorida dari *N-(1-adamantyl) acetamide* yang menggunakan 2 tahapan prosedur dapat meningkatkan persentase hasil menjadi 67%. Prosedur sintesisnya dapat dioptimalisasi untuk meminimalkan penggunaan larutan dan reagen yang bersifat toksik, ramah lingkungan serta dapat digunakan untuk produksi amantadin hidroklorida dalam skala besar (Vu et al. 2017).

Penggunaan rimantadine baru mendapatkan persetujuan dari FDA untuk pengobatan infeksi influenza pada tahun 1990 (Prichard 1971). Rimantadine hidroklorida (*α-methyl-1-adamantane-methalamine hydrochloride*) menghambat konduktansi proton dari saluran ion M2. Perubahan kimia isotropik berpengaruh terhadap ikatan ke saluran proton. Interaksi kompleks antara (R)-rimantadine dan saluran proton M2 meningkatkan stabilitas obat antiviral di pori saluran (Wright et al. 2016). Rimantadine hidroklorida digunakan untuk terapi infeksi yang disebabkan oleh berbagai macam virus RNA, khususnya virus influenza A. Sintesis rimantadine *Schiff bases* (RSB) yaitu rimantadine-*salicylaldehyde* (RS), rimantadine-*o-vanillin* (ROV) dan rimantadine-4-*methoxy-salicylaldehyde* (RMS) mempunyai aktivitas biologis yang lebih baik (Liu et al. 2014).

Rimantadine (R)-enansiomer berikatan dengan pori protein M2 dengan afinitas yang lebih tinggi daripada (S)-enansiomer tetapi kedua enansiomer tersebut memiliki kemiripan dalam hal kemampuan penyumbatan saluran proton M2, afinitas, dan potensi antivirus. Rimantadine enantiomer (2-R dan 2-S) mempunyai kemampuan mengikat saluran proton M2, penyumbatan saluran dan aktivitas antiviral yang sama dengan amantadine yang bersifat efektif terhadap saluran proton M2 (Drakopoulos et al. 2017).

### RESISTENSI ANTIVIRAL GOLONGAN ADAMANTANE

Amantadine merupakan penghambat saluran M2 H<sup>+</sup> virus. Virus dapat menghindari dari penyumbatan antiviral pada saluran M2H<sup>+</sup>nya melalui dua rute alternatif yaitu: 1) saluran tidak lagi mengikat pemblokir sehingga pemblokir tidak bisa menggunakan fungsi penghambatannya; dan 2) pengikatan *blocker* dipertahankan, tetapi fungsi protein tidak berfungsi. Karakteristik diameter pori seperti penambahan ukuran saluran menunjukkan mekanisme molekuler munculnya resistensi virus baru. Meskipun obat mengikat saluran, obat antiviral tidak dapat memblokir pori-pori, karena diameter saluran telah membesar (Astrahan et al. 2004).

Terapi antiviral golongan adamantane pada unggas secara terus menerus dapat menjadi faktor timbulnya resistensi golongan adamantane. Adamantane adalah obat anti-influenza yang efektif sampai munculnya resistensi virus terhadap adamantane. Berdasarkan analisis asam amino, sebanyak 31.251 virus influenza A dengan sub tipe yang berbeda (H1-H17) yang diisolasi di dunia dari tahun 1902 hingga 2013 telah resisten terhadap adamantane. Resistensi tersebut mengalami peningkatan secara terus menerus. Sub tipe HA, spesies inang, tahun isolasi, dan wilayah geografis berpengaruh terhadap frekuensi munculnya varian influenza yang resisten terhadap adamantane. Mutasi gen M2 pada marker resistensi adamantane diidentifikasi pada virus influenza A sub tipe H1, H3, H5, H7, H9, dan H17 dalam jumlah yang sangat tinggi tetapi mutasi pada marker resistensi amantadin jarang ditemukan pada sub tipe H2, H4, H6, H10, dan H11. Namun demikian, sub tipe H8, H12, H13, H14, H15, H16 tidak menunjukkan resistensi terhadap adamantane (Dong et al. 2015).

Resistensi virus A (H1N1) terhadap adamantane dideteksi di sebagian besar negara di dunia dari tahun



2009–2012. Virus H7N9 yang mengalami mutasi pada *marker* resistensi adamantane hanya ditemukan di daratan Cina dan Taiwan pada tahun 2003. Sebagian besar subtipe H5N1 yang resisten terhadap adamantane dilaporkan di Thailand, Kamboja, dan Vietnam (Dong et al. 2015). Mutasi Ser31Asn pada protein M2 virus AI dilaporkan di Indonesia (Smith et al. 2006). Virus avian influenza yang diisolasi di Indonesia sepanjang tahun 2003-2008 mengalami mutasi pada posisi 27 atau 31 (V27A atau S31N) sebesar 66,328% (91/146) dan bersifat resisten terhadap amantadin. Mutasi tunggal maupun ganda mampu menginduksi resistensi terhadap amantadin (Dharmayanti et al. 2010).

Mekanisme resistensi terhadap amantadin yang disebabkan mutasi S31N dapat digambarkan oleh *overlaying* struktur *lipidic cubic phase* (LCP) yang baru dengan struktur kristal M2 sebelumnya. Substitusi Ser31 menjadi Asn juga menyebabkan kelebihan atom hidrofilik pada situs yang berinteraksi dengan daerah hidrofobik amantadin (Thomaston & Grado 2016).

Virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 belum banyak bermutasi di posisi 26, 27, 30, 31 dan 34 protein M2. Virus AI subtipe H5N1 yang mengalami mutasi L26I dan S31N dari Vietnam adalah *clade* 1.1 tetapi virus *clade* 2.3.2.1c tidak menunjukkan perubahan pada protein M2 yaitu 26L, 27V, 30A, 31S, dan 34G (Nguyen et al. 2016). Namun demikian, virus *clade* 2.3.2 mengalami mutasi pada posisi 27 (V27I). Sekuen asam amino protein M2 virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2.1 dari Indonesia dan Vietnam mempunyai kemiripan (Dharmayanti et al. 2013; Dharmayanti et al. 2014).

Analisis filogenetik gen Matrik (M2) dari virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2.1c asal Indonesia (Hewajuli 2017) berada dalam satu kelompok dengan virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 asal Vietnam, Cina dan Hongkong seperti virus AI subtipe H5N1 (*A/magpie robbin/Hongkong/1097/2008*, *A/blackcrowned night hero/Hongkong/659/2008*) yang diisolasi dari unggas air liar di Hongkong (Smith et al. 2009; Wan et al. 2011), *virus H5N1 A/duck /Zhejiang/2244/2011* dari Cina dan sebagian besar virus H5N1 yang diisolasi dari unggas air di Vietnam (Naguib et al. 2015; Le & Nguyen 2014).

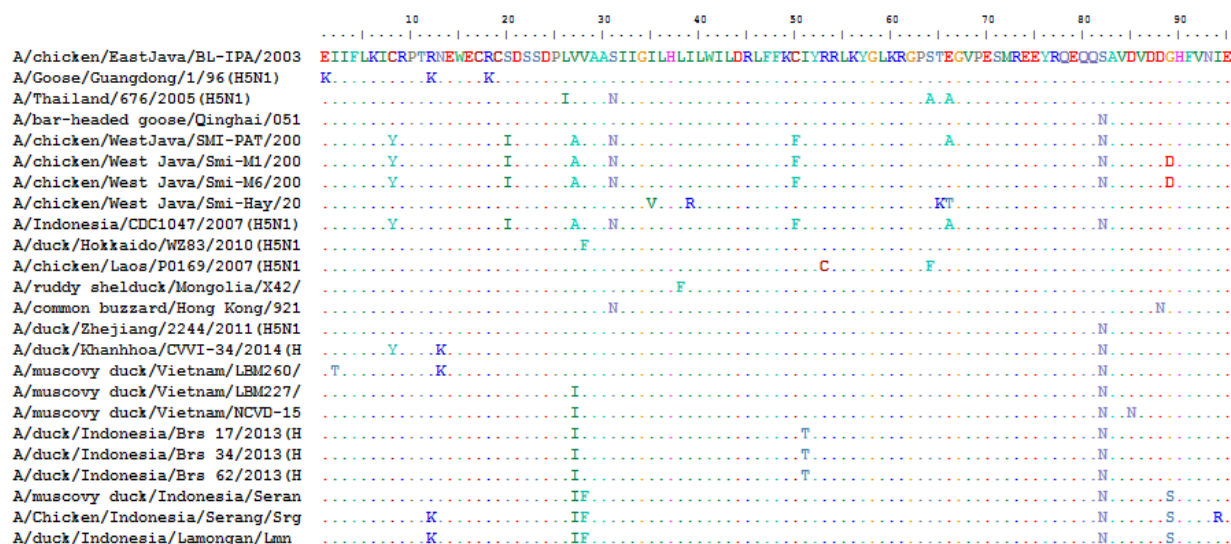
Virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 asal Indonesia yang diisolasi tahun 2016 mempunyai kedekatan dengan kelompok virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 asal Vietnam yang mempunyai residu V27I pada protein M2. Hasil *multiple sequence alignment* dan translasi protein M2 virus AI subtipe H5N1 asal Indonesia menunjukkan residu V27I ditunjukkan pada Gambar 2 (Hewajuli 2017). Virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 yang diisolasi pada waktu wabah kematian itik (Dharmayanti et al. 2013) mempunyai karakter

perubahan asam amino V27I yang sama dengan virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 yang diisolasi tahun 2016. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan asam amino virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 di Indonesia masih sama sampai dengan tahun 2016 (Hewajuli 2017). Virus *clade* 2.3.2.1 yang diisolasi dari Bulgaria juga tidak menunjukkan mutasi (26L, 27V, 30A, 31S, dan 34G) pada domain transmembran protein Matrik (Petkova et al. 2012).

Pola residu pada transmembran protein M2 virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 terlihat berbeda dari virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.1 karena sebagian besar virus *clade* 2.1 yang bersirkulasi di Asia Tenggara khususnya Indonesia mengalami substitusi tunggal maupun ganda pada residu *marker* resistensi amantadin (V27A dan S31N). Analisis genetik resistensi amantadin berdasarkan substitusi asam amino pada residu Leu26, Val27, Ala30, Ser31, Gly34, His37 dan Trp41 domain transmembran protein M2. Sebagian besar virus influenza yang resisten terhadap amantadin dapat mempunyai satu atau lebih perubahan asam amino karena substitusi tunggal atau ganda menyebabkan hilangnya sensitivitas *blocker* M2 (Cheung et al. 2006; Dharmayanti 2010).

Substitusi asam amino V27I pada protein M2 virus AI subtipe H5N1 yang diisolasi pada tahun 2016 adalah unik pada *marker* resistensi virus AI terhadap amantadin karena biasanya virus AI subtipe H5N1 yang resisten terhadap amantadin mempunyai substitusi asam amino V27A. Konfirmasi hasil molekuler analisis asam amino protein M2 dengan hasil uji invitro sangat penting dilakukan untuk mengetahui resistensi virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 asal Indonesia terhadap amantadin. Virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 asal Indonesia yang mempunyai substitusi V27I pada protein M2 bersifat resisten terhadap amantadin karena menyebabkan efek sitopatik dan virus tetap berkembang biak pada sel MDCK konfluen *monolayer* yang mengandung *amantadine hydrochloride* dengan konsentrasi tertinggi yang tidak toksik terhadap sel MDCK (Hewajuli 2017).

*Novel marker* genetik amantadin resisten pada gen M2 (V27I) juga diidentifikasi pada sebagian besar virus Vietnam yang diisolasi dari unggas air dari tahun 2012 sampai dengan 2015 berdasarkan analisis *multiple sequence alignment* dan translasi protein M2. Keberadaan substitusi V27I yang unik pada protein M2 kemungkinan berperan terhadap resistensi virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 terhadap amantadin (Hewajuli 2017). Mutasi Val27Ile pada *marker* resistensi amantadin virus AI subtipe H5N1 *clade* 2.3.2 di Indonesia kemungkinan merupakan introduksi dari luar (Dharmayanti et al. 2014).



**Gambar 2.** Multiple sequence alignment dan translasi protein M2 virus AI subtype H5N1 clade 2.3.2 asal Indonesia dan beberapa virus H5N1 dari *genbank*

Sumber: Hewajuli (2017)

Pengobatan atau profilaksis infeksi virus AI di peternakan unggas dengan menggunakan antiviral dapat meningkatkan resistensi virus. Sebagian besar (83,3%) virus AI subtype H5N1 yang diisolasi dari unggas di Cina Utara telah resisten terhadap amantadin. Mutasi asam amino protein M2 pada marker yang resistensi amantadin ditemukan pada virus AI yang diisolasi dari unggas kemungkinan disebabkan oleh penggunaan amantadin yang bertujuan untuk profilaksis dan digunakan secara terus menerus (He et al. 2008).

### KOMBINASI OBAT ANTIVIRAL

Sebagian besar virus influenza A yang bersirkulasi telah resisten terhadap adamantane (amantadin, rimantadin). Timbulnya resistensi *neuraminidase inhibitor* menyebabkan virus avian influenza mengalami resistensi ganda terhadap adamantane dan *neuraminidase inhibitor*. Pengembangan kombinasi obat antiviral diperlukan untuk meningkatkan efikasi pengobatan virus yang telah resisten terhadap golongan adamantane maupun *neuraminidase inhibitor*. Kombinasi obat bekerja secara sinergis pada tahap yang berbeda dalam siklus replikasi virus sehingga dapat mengurangi resiko perkembangan resistensi. Terapi kombinasi antiviral amantadine, oseltamivir, dan ribavirin mempunyai efikasi yang tinggi untuk pengobatan infeksi virus influenza yang sensitif maupun resisten terhadap antiviral serta dapat menurunkan angka kematian akibat infeksi virus influenza. Terapi kombinasi antiviral amantadine, oseltamivir, dan ribavirin bersifat efektif pada pasien

yang berisiko tinggi mengalami komplikasi serius akibat infeksi influenza (Nguyen et al. 2012). Faktor keamanan merupakan pertimbangan yang sangat penting diperhatikan ketika memberikan terapi kombinasi antiviral pada pasien yang immunosupresi. Pasien immunosupresi biasanya membutuhkan durasi pengobatan lebih lama karena tidak dapat merespon dengan cepat terapi. Selain faktor keamanan, interaksi yang sinergis diantara masing masing antiviral yang diberikan secara kombinasi merupakan faktor yang sangat penting untuk diperhatikan. Kombinasi antiviral amantadin, oseltamivir, dan ribavirin mempunyai efek farmakokinetik yang sama dengan antiviral tunggal, bersifat aman bagi pasien yang immunosupresi, lebih cepat menurunkan titer virus dalam tubuh serta dapat mencegah resistensi (Seo et al. 2013).

### KESIMPULAN

Adamantane adalah obat yang efektif sampai munculnya resistensi virus terhadap adamantane. Sebagian besar virus avian influenza masih sensitif terhadap antiviral golongan *neuraminidase inhibitor* sehingga pengobatan dan pencegahannya mengandalkan antiviral golongan *neuraminidase inhibitor*. Resistensi antiviral golongan *M2 blocker* dan *neuraminidase inhibitor* ditemukan pada virus avian influenza dari unggas dan manusia. Obat golongan *M2 blocker* dan *neuraminidase inhibitor* digunakan untuk pengendalian penyakit influenza pada manusia. Pengembangan kombinasi obat adamantane dan *neuraminidase inhibitor* dapat mengurangi resiko

resistensi karena kombinasi bekerja sinergis pada tahap pada siklus replikasi virus.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abed Y, Pizzorno A, Boivin G. 2012. Therapeutic activity of intramuscular peramivir in mice infected with are combinant influenza A/WSN/33(H1N1) virus containing the H275Y neuraminidase mutation. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:4375-4380.
- Achenbach JE, Bowen RA. 2013. Effect of oseltamivir carboxylate consumption on emergence of drug-resistant H5N2 avian influenza virus in Mallard ducks. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:2171-2181.
- Alves Galvão MG, Rocha Crispino Santos MA, Alves da Cunha AJL. 2014. Amantadine and rimantadine for influenza A in children and the elderly. *Cochrane Database Syst Rev.* 11:CD002745. doi: 10.1002/14651858.CD002745.pub4.
- Astrahan P, Kass I, Cooper MA, Arkin IT. 2004. A novel method of resistance for influenza against a channel-blocking antiviral drug. *Proteins.* 55:251-257.
- Azuma T, Ishiuchi H, Inoyama T, Teranishi Y, Yamaoka M, Sato T, Yamashita N, Tanaka H, Mino Y. 2015. Detection of peramivir and laninamivir, new anti-influenza drugs, in sewage effluent and river waters in Japan. *PLoS One.* 10:e0131412. doi: 10.1371/journal.pone.0131412.
- Babu YS, Chand P, Bantia S, Kotian P, Dehghani A, El-Kattan Y, Lin TH, Hutchison TL, Elliott AJ, Parker CD, Ananth LS, Horn LL, Laver GW, Montgomery JA. 2000. BCX-1812 (RWJ-270201): Discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. *J Med Chem.* 43:3482-3486.
- Baumann J, Kouassi NM, Foni E, Klenk H, Matrosovich M. 2016. H1N1 swine influenza viruses differ from avian precursors by a higher pH optimum of membrane fusion. *J Virol.* 9:1569-1577.
- Belser JA, Brock N, Sun X, Jones J, Zanders N, Hodges E, A. Pulit-Penaloza J, Wentworth D, Tumpey TM, Davis T, Maines TR. 2018. Mammalian pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) viruses, Tennessee, USA, 2017. *Emerg Infect Dis.* 24:149-152.
- Benton DJ, Wharton SA, Martin SR, McCauley JW. 2017. Role of neuraminidase in influenza A (H7N9) virus receptor binding. *J Virol.* 91:e02293-16. doi: 10.1128/JVI.02293-16
- Boulo S, Akarsu H, Ruigrok RW, Baudin F. 2007. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res.* 124:12-21.
- [CDC] Centre for Disease Prevention and Control. Influenza Antiviral Medications: Summary for Clinicians | Health Professionals | Seasonal Influenza (Flu), 2018. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/profes>
- Chen W, Sun S, Li Z. 2012. Two glycosylation sites in H5N1 influenza virus hemagglutinin that affect binding preference by computer-based analysis. *PLoS One.* 7:e38794. doi: 10.1371/journal.pone.0038794.
- Cheung CL, Rayner RM, Smith GJD, Wang P, Naipospos TSP, Zhang J, Yuen KY, Webster RG, Peiris JSM, Guan Y, Chen H. 2006. Distribution of amantadine-resistant H5N1 avian influenza variants in Asia. *J Infect Dis.* 193:1626-1629.
- Cohen M, Zhang XQ, Senaati HP, Chen HW, Varki NM, Schooley RT, Gagneux P. 2013. Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virology.* 10:321.
- De Conto F, Covan S, Arcangeletti MC, Orlandini G, Gatti R, Dettori G, Chezzi C. 2011. Differential infectious entry of human influenza A/NWS/33 virus (H1N1) in mammalian kidney cells. *Virus Res.* 155:221-230.
- Dharmayanti NLPI, Ibrahim F, Soebandrio A. 2010. Amantadine resistant of Indonesian influenza H5N1 subtype virus during 2003-2008. *Microbiol Indones.* 5:11-16.
- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Hewajuli DA, Hardiman, Wibawa H, Pudjiatmoko. 2013. Karakteristik molekuler dan patogenesis virus H5N1 Clade 2.3.2. asal Indonesia. *JITV.* 18:99-113.
- Dharmayanti NLPI, Hartawan R, Pudjiatmoko, Wibawa H, Hardiman, Balish A, Donis R, Davis CT, Samaan G. 2014. Genetic characterization of Clade 2.3.2.1 Avian Influenza A (H5N1) Viruses, Indonesia, 2012. *Emerg Infect Dis.* 20:671-674.
- Dong H, Fiorin G, DeGrado WF, Klein ML. 2014. Proton release from the histidine-tetrad in the M2 channel of the influenza A virus. *J Phys Chem B.* 118:12644-12651.
- Dong G, Peng C, Luo J, Wang C, Han L, Wu B, Ji G, He H. 2015. Adamantane-resistant influenza A viruses in the world (1902-2013): Frequency and distribution of M2 gene mutations. *PLoS One.* 10:e0119115.
- Douglas Jr RG. 1990. Antimicrobial agents. In: Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* New York (USA): Pergamon Press.
- Drakopoulos A, Tzitzoglaki C, Ma C, Freudenberger K, Hoffmann A, Hu Y, Gauglitz G, Schmidtke M, Wang J, Kolocouris A. 2017. Affinity of rimantadine enantiomers against influenza A/M2 protein revisited. *ACS Med Chem Lett.* 8:145-150.
- Durrant MG, Egget DL, Busath DD. 2015. Investigation of a recent rise of dual amantadine-resistance mutations in the influenza A M2 sequence. *BMC Genet.* 16:S3.
- Franca M, Stallknecht DE, Howerth EW. 2013. Expression and distribution of sialic acid influenza virus receptors in wild birds. *Avian Pathol.* 42:60-71.

- Gillespie L, Roosendahl P, Ng WC, Brooks AG, Reading PC, Londrigan SL. 2016. Endocytic function is critical for influenza A virus infection via DCSIGN and L-SIGN. *Sci Rep.* 6:19428. doi: 10.1038/srep19428
- Gillman A, Muradrasoli S, Mardnas A, So"derstro"m H, Fedorova G, Lowenthal M, Wille M, Daggfeldt A. 2015a. Oseltamivir resistance in influenza A (H6N2) caused by an R292K substitution in neuraminidase is not maintained in mallards without drug pressure. *PLoS One.* 10:e0139415.
- Gillman A, Nykvist M, Muradrasoli S, So" derstro"m H, Wille M, Daggfeldt A, Brojer C, Waldenstr"om J, Olsen B, J"arhult JD. 2015b. Influenza A (H7N9) virus acquires resistance-related neuraminidase I222T substitution when infected mallards are exposed to low levels of oseltamivir in water. *Antimicrob Agents Chemother.* 59:5196-5202.
- Gu RX, Liu LA, Wei DQ, Du JG, Liu L, Liu H. 2011. Free energy calculations on the two drug binding sites in the M2 proton channel. *J Am Chem Soc.* 133:10817-10825.
- He G, Qiao J, Dong C, He C, Zhao L, Tian Y. 2008. Amantadine-resistance among H5N1 avian influenza viruses isolated in Northern China. *Antiviral Res.* 77:72-76.
- Hewajuli DA. 2017. Sensitivitas virus avian influenza subtype H5N1 clade 2.3.2 asal Indonesia terhadap obat antiviral amantadin [Tesis]. [Bogor (Indonesia)]: Institut Pertanian Bogor.
- Hoopes JD, Driebe EM, Kelley E, Engelthaler DM, Keim PS, Perelson AS, Rong L, Went GT, Nguyen JT. 2011. Triple combination antiviral drug (TCAD) composed of amantadine, oseltamivir, and ribavirin impedes the selection of drug-resistant influenza A virus. *PLoS One.* 6:e29778. doi: 10.1371/journal.pone.0029778.
- Hu F, Schmidt-Rohr K, Hong M. 2012. NMR detection of pH-dependent histidine-water proton exchange reveals the conduction mechanism of a transmembrane proton channel. *J Am Chem Soc.* 134:3703-3713.
- Hu Y, Lu S, Song Z, Wang W, Hao P, Li J, Zhang X, Yen H, Shi B, Li T, Guan W, Xu L, Liu Y, Wang S, Zhang X, Tian D, Zhu Z, He J, Huang K, Chen H, Zheng L, Li X, Ping J, Kang B, Xi X, Zha L, Li Y, Zhang Z, Peiris M, Yuan Z. 2013. Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance. *Lancet.* 381:2273-2279.
- Huang L, Cao Y, Zhou J, Qin K, Zhu W, Zhu Y, Yan L, Wang D, Wei H, Shu Y. 2014. A conformational restriction in the influenza A virus neuraminidase binding site by R152 results in a combinational effect of I222T and H274Y on oseltamivir resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:1639-1645.
- Hurt AC, Lee RT, Leang SK, Cui L, Deng YM, Phuap SP, Caldwell N, Freeman K, Komadina N, Smith D, Speers D, Kelso A, Lin RT, Maurer-Stroh S, Barr IG. 2011. Increased detection in Australia and Singapore of a novel influenza A(H1N1)2009 variant with reduced oseltamivir and zanamivir sensitivity due to a S247N neuraminidase mutation. *Eurosurveillance [Internet].* 16:19884. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19884>
- Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ, Deng YM, Osbourn M, Leang SK, Lee RT, Iannello P, Gehrig N, Shaw R, Wark P, Caldwell N, Givney RC, Xue L, Maurer-Stroh S, Dwyer DE, Wang B, Smith DW, Levy A, Booy R, Dixit R, Merritt T, Kelso A, Dalton C, Durrheim D, Barr IG. 2012. Characteristics of a widespread community cluster of H275Y oseltamivir-resistant A (H1N1) pdm09 influenza in Australia. *J Infect Dis.* 206:148-157.
- Ishizuka H, Yoshida S, Okabe H, Yoshihara K. 2010. Clinical pharmacokinetics of laninamivir, a novel long-acting neuraminidase inhibitor, after single and multiple inhaled doses of its prodrug, CS-8958, in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol.* 50:1319-1329. doi: 10.1177/0091270009356297.
- Ikematsu H, Kawai N, Iwaki N, Kashiwagi S. 2015. In vitro neuraminidase inhibitory activity of four neuraminidase inhibitors against clinical isolates of influenza virus in the Japanese 2012-2013 season. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother.* 21:39-42.
- Kalashnikov AI, Sysolyatin SV, Sakovich GV, Sonina EG, Shchurova IA. 2013. Facile method for the synthesis of oseltamivir phosphate. *Russ Chem Bull.* 62:163-170.
- Kim CU, Lew W, Williams MA, Liu H, Zhang L, Swaminathan S, Bischofberger N, Chen MS, Mendel DB, Tai CY, Laver WG, Stevens RC. 1997. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J Am Chem Soc.* 119:681-690. doi: 10.1021/ja963036t.
- Kiso M, Kubo S, Ozawa M, Le QM, Nidom CA, Yamashita M, Kawaoka Y. 2010. Efficacy of the new neuraminidase inhibitor CS-8958 against H5N1 influenza viruses. *PLoS Pathog.* 6:e1000786.
- Le TH, Nguyen NT. 2014. Evolutionary dynamics of highly pathogenic avian influenza A/H5N1 HA Clades and vaccine implementation in Vietnam. *Clin Exp Vaccine Res.* 3:117-127.
- Lee N, Leo YS, Cao B, Chan PK, Kyaw WM, Uyeki TM, Tam WWS, Cheung CSK, Yung IMH, Li H, Gu L, Liu Y, Liu Z, Qu J, Hui DS. 2015. Neuraminidase inhibitors, superinfection and corticosteroids affect survival of influenza patients. *Eur Respir J.* 45:1642-1652.
- Li JH, Dohna Z, Anchell NL, Adams SC, Dao NT, Xing Z, Cardona CJ. 2010. Adaptation and transmission of a

- duck-origin avian influenza virus in poultry species. *Virus Res.* 147:40-46.
- Liang R, Li H, Swanson JM, Voth GA. 2014. Multiscale simulation reveals a multifaceted mechanism of proton permeation through the influenza A M2 proton channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111:9396-9401. doi: 10.1073/pnas.1401997111.
- Liang L, Deng G, Shi J, Wang S, Zhang Q, Kong H, Gu C, Guan Y, Suzuki Y, Li Y, Jiang Y, Tian G, Liu L, Li C, Chen H. 2016a. Genetics, receptor binding, replication, and mammalian transmission of H4 avian influenza viruses isolated from live poultry markets in China. *J Virol.* 90:1455-1469.
- Liang R, Swanson JMJ, Madsen JJ, Hong M, DeGradoe WF, Voth GA. 2016b. Acid activation mechanism of the influenza A M2 proton channel. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113:E6955-E6964. doi: 10.1073/pnas.1615471113.
- Lin PH, Chao TL, Kuo SW, Wang JT, Hung CC, Lin HC, Yang ZY, Ho SY, Chang CK, Huang MS, Chen HH, Chen YC, Lai HS, Chang SY, Chang SC, Yang PC. 2014. Virological, serological, and antiviral studies in an imported human case of Avian Influenza A (H7N9) Virus in Taiwan. *Clin Infect Dis.* 58:242-246.
- Liu B, Ma P, Wang X, Kong Y, Zhang L, Liu B. 2014. Synthesis of three rimantadine schiff bases and their biological effects on serum albumin. *Iran J Pharmaceu Res.* 13:1183-1190.
- Matrosovich MN, Gambaryan AS, Teneberg S, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, Robertson JS, Karlsson KA. 1997. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology.* 233:224-234.
- Naguib MM, Kinne J, Chen H, Chan K, Joseph S, Wong P, Woo PCY, Wernery R, Beer M, Wernery U, Harder TC. 2015. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza H5N1 Clade 2.3.2.1c in hunting falcons and kept wild birds in Dubai implicate intercontinental virus spread. *J Gen Virol.* 96:3212-3222.
- Nguyen JT, Smee DF, Barnard DL, Julander JG, Gross M, Jong MD, Went GT. 2012. Efficacy of combined therapy with amantadine, oseltamivir, and ribavirin in vivo against susceptible and amantadine-resistant influenza A viruses. *PLoS One.* 7:e31006. doi: 10.1371/journal.pone.0031006.
- Nguyen TH, Than VT, Thanh HD, Hung VK, Nguyen DT, Kim W. 2016. Intersubtype reassortments of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza viruses isolated from quail. *PLoS One.* 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0149608
- Palese P, Tobita K, Ueda M, Compans RW. 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology.* 61:397-410.
- Petkova AM, Georgiev G, Seiler P, Darnell D, Franks J, Krauss S, Webby RJ, Webster RG. 2012. Spread of influenza virus A (H5N1) Clade 2.3.2.1 to Bulgaria in common buzzards. *Emerg Infect Dis.* 18:1596-1602.
- Prichard WW. 1971. Pharmaceutical compositions and methods of controlling influenza a virus infection utilizing substituted adamantanes and tricyclo (4.3.1.13. 8) undecanes. United States patent US 3,592,934.
- Rudrawar S, Dyason JC, Rameix-Welti MA, Rose FJ, Kerry PS, Russell RJ, van der Werf S, Thomson RJ, Naffakh N, von Itzstein M. 2010. Novel sialic acid derivatives lock open the 150-loop of an influenza A virus group-1 sialidase. *Nat Commun.* 1:113. doi: 10.1038/ncomms1114.
- Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, Collins PJ, Lin YP, Blackburn GM, Hay AJ, Gamblin SJ, Skehel JJ. 2006. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature.* 443:45-49.
- Seladi-Schulman J, Steel J, Lowen AC. 2013. Spherical influenza viruses have a fitness advantage in embryonated eggs, while filament-producing strains are selected *in vivo*. *J Virol.* 87:13343-13353.
- Seladi-Schulman J, Campbell PJ, Suppiah S, Steel J, Lowen AC. 2014. Filament-producing mutants of influenza A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) virus have higher neuraminidase activities than the spherical wild-type. *PLoS One.* 9:e112462. doi: 10.1371/journal.pone.0112462.
- Seo S, Englund JA, Nguyen JT, Pukrittayakamee S, Lindegardh N, Tarning J, Tambyah PA, Renaud C, Went GT, deJong MD, Boeckh MJ. 2013. Combination therapy with amantadine, oseltamivir, and ribavirin for influenza A infection:safety and pharmacokinetics. *Antiviral Therapy.* 18:377-386.
- Smith GJD, Naipospos TSP, Nguyen TD, De Jong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hassa SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YHC, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, Zhang LJ, Poon LLM, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JSM, Guan Y. 2006. Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology.* 350:258-268.
- Smith GJ, Vijaykrishna D, Ellis TM, Dyrting KC, Leung YH, Bahl J, Wong CW, Kai H, Chow MKW, Duan L, Chan ASL, Zhang LJ, Chen H, Luk GSM, Peiris JSM, Guan Y. 2009. Characterization of avian influenza viruses A (H5N1) from wild birds, Hong Kong, 2004–2008. *Emerg Infect Dis.* 15:402-407.
- Stauffer SY, Feng, Nebioglu F, Heilig R, Picotti P, Helenius A. 2014. Stepwise priming by acidic pH and ahigh K+ concentration is required for efficient uncoating of influenza A virus cores after penetration. *J Virol.* 88:13029-13046.
- Short KR, Brooks AG, Reading PC, Londrigan SL. The fate of influenza A virus after infection of human

- macrophages and dendritic cells. *J Gen Virol.* 93:2315-2325.
- Thaa B, Levental I, Herrmann A, Veit M. 2011. Intrinsic membrane association of the cytoplasmic tail of influenza virus M2 protein and lateral membrane sorting regulated by cholesterol binding and palmitoylation. *Biochem J.* 437:389-397.
- Thomaston JL, Alfonso-Prieto M, Woldeyes RA, Fraser JS, Klein ML, Fiorin G, DeGrado WF. 2015. High-resolution structures of the M2 channel from influenza A virus reveal dynamic pathways for proton stabilization and transduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112:14260-14265. doi: 10.1073/pnas.1518493112.
- Thomaston JL, Grado WFD. 2016. Crystal structure of the drug-resistant S31N influenza M2 proton channel. *Prot Sci.* 25:1551-1554.
- Vachieri SG, Xiong X, Collins PJ, Walker PA, Martin SR, Haire LF, Zhang Y, McCauley JW, Gamblin SJ, Skehel JJ. 2014. Receptor binding by H10 influenza viruses. *Nature.* 511:475-477.
- Von Itzstein M, Wu WY, Kok GB, Pegg MS, Dyason JC, Jin B, Phan TV, Smythe ML, White HF, Oliver SW, Colman PM, Varghese JN, Ryan DM, Woods JM, Bethell RC, Hotham VJ, Cameron JM, Penn CR. 1993. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature.* 363:418-423. doi: 10.1038/363418a0.
- Von Itzstein M. 2007. The war against influenza: Discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev.* 6:967-974.
- Vu DB, Nguyen TV, Le ST, Phan CH. 2017. An improved synthesis of amantadine hydrochloride. *Org Process Res Dev.* 21:1758-1760.
- Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk HD. 2000. Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: A study by reverse genetics. *J Virol.* 74:6316-6323.
- Wan X, Dong L, Lan Y, Long L, Xu C, Zou S, Li Z, Wen L, Cai Z, Wang W, Li X, Yuan F, Sui H, Zhang Y, Dong J, Sun S, Gao Y, Wang M, Bai T, Yang L, Li D, Yang W, Yu H, Wang S, Feng Z, Wang Y, Guo Y, Webby RJ, Shu Y. 2011. Indications that live poultry markets are a major source of human H5N1 influenza virus infection in China. *J Virol.* 85:13432-13438.
- Wang D, Harmon A, Jin J, Francis DH, Christopher-Hennings J, Nelson E, Montelaro RC, Li F. 2010. The lack of an inherent membrane targeting signal is responsible for the failure of the matrix (M1) protein of influenza A virus to bud into virus-like particles. *J Virol.* 84:4673-4681.
- Watanabe A, Chang SC, Kim MJ, Chu DW, Ohashi Y, MARVEL Study Group. 2010. Long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate versus oseltamivir for treatment of influenza: a double-blind, randomized, noninferiority clinical trial. *Clin Infect Dis.* 51:1167-1175.
- Woods JM, Bethell RC, Coates JAV, Healy N, Hiscox SA, Pearson BA, Ryan DM, Ticehurst J, Tilling J, Walcott SM, Penn CR. 1993. 4-Guanidino-2,4-Dideoxy-2,3-Dehydro-N-Acetylneuraminic Acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza a and b viruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemoth.* 37:1473-1479.
- Wright AK, Batsomboon P, Dai J, Hung I, Zhou H, Dudley GB, Cross TA. 2016. Differential binding of rimantadine enantiomers to influenza a M2 proton channel. *Cross J Am Chem Soc.* 138:1506-1509. doi: 10.1021/jacs.5b13129.
- Wu WL, Siu-Ying L, Yixin C, Genyan W, Bobo WM, Wen X, Pui W, Wenjun S, Tianwei L, Kwok-Hung C, Kwok-Yung Y, Chen H. 2012. The 2008–2009 H1N1 influenza virus exhibits reduced susceptibility to antibody inhibition: Implications for the prevalence of oseltamivir resistant variant viruses. *Antiviral Res.* 93:144-153.
- Yamashita M, Tomozawa T, Kakuta M, Tokumitsu A, Nasu H, Kubo S. 2009. CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:186-192. doi: 10.1128/AAC.00333-08.
- Yang ZF, Mok CK, Peiris JS, Zhong NS. 2015. Human infection with a novel avian influenza A (H5N6) virus. *N Engl J Med.* 373:487-489. doi: 10.1056/NEJMc1502983.
- Zaraket H, Dapat C, Ghanem S, Ali Z, Lteif M, Kondo H, Dapat IC, Saito K, Kayali G, Suzuki H, Dbaibo G, Saito R. 2014. Characterization of human influenza viruses in Lebanon during 2010–2011 and 2011–2012 post-pandemic seasons. *Intervirology.* 57:344-352. doi: 10.1159/000365758
- Zhang Y, Whittaker GR. 2014. Influenza entry pathways in polarized MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 450:234-239. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.095.
- Zhang X, Song Z, He J, Yen H, Li J, Zhu Z, Tian D, Wang W, Xu L, Guan W, Liu Y, Wang S, Shi B, Zhang W, Qin B, Cai J, Wan Y, Xu C, Ren X, Chen H, Liu L, Yang Y, Zhou X, Zhou W, Xu J, Zhang X, Peiris M, Hu Y, Yuan Z. 2014. Drug susceptibility profile and pathogenicity of H7N9 influenza virus (Anhui lineage) with R292K substitution. *Emerg Microbes Infect.* 3:e78. doi:10.1038/emi.2014.80.
- Zhu XB, Wang M, Wang SZ, Yao ZJ. 2012. Concise synthesis of zanamivir and its C4-thiocarbamido derivatives utilizing a 3 + 2-cycloadduct derived from D-glucono-delta-lactone. *Tetrahedron.* 68:2041-2044.