

Karakter Genetik Protein Membran Virus Avian Influenza Subtipe H5N1

N.L.P. INDI DHARMAYANTI¹, D.A. HEWAJULI¹, A.K RATNAWATI¹, R. INDRIANI¹ dan DARMINTO²

¹Balai Besar Penelitian Veteriner JL RE Martadinata 30, Bogor

²Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan JL Raya Pajajaran, Bogor

(Diterima dewan redaksi 26 Juli 2010)

ABSTRACT

DHARMAYANTI, N.L.P.I., D.A. HEWAJULI, A. RATNAWATI, R. INDRIANI and DARMINTO. 2010. Genetic characteristic of protein membran of avian influenza viruses H5N1 subtype. *JITV* 15(3): 231-239.

In 2006-2008 there were findings about the antigenic drift on AI virus due to vaccination and the AI H5N1 subtype viruses which was similar to H5N1 viruses in human. The findings indicated that the AI viruses continue and undergoing to mutate and try to adapt with their environment. The objective of this study to characterize the mutation of recent AI viruses (2009) on the membran protein namely Hemagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) and Matrix 2 (M2). In this study RT-PCR – sequencing methods and genetic analysis for the protein membran of AI viruses were used. Result revealed that there were specific mutation belong to AI 2009 viruses on HA and NA protein such as AI virus mutation in 2008 which isolated from backyard chicken. The mutations were non synonymous and not caused by immunological pressure. Furthermore, M2 analysis indicated that the viruses were resistant to amantadine.

Key Words: Mutation, AI Subtype H5N1 Viruses, Membran Protein

ABSTRAK

DHARMAYANTI, N.L.P.I., D.A. HEWAJULI, A. RATNAWATI, R. INDRIANI dan DARMINTO. 2010. Karakter Genetik Protein Membran virus avian influenza subtipe H5N1. *JITV* 15(3): 231-239.

Ditemukannya virus AI yang mengalami *antigenic drift* akibat vaksinasi pada tahun 2006, 2007 dan 2008 serta beberapa virus yang mempunyai kemiripan dengan virus H5N1 pada manusia memperlihatkan virus AI subtipe H5N1 di Indonesia sedang dan terus bermutasi dan berusaha beradaptasi dengan lingkungannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter mutasi pada tiga protein membran yaitu Hemagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) dan Matrix 2 (M2) pada virus AI subtipe H5N1 yang diisolasi pada tahun 2009. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah propagasi virus pada telur *specific pathogen free* (SPF) dan karakterisasi dilakukan dengan RT-PCR sekuensing pada tiga protein membran virus AI subtipe H5N1 tahun 2009 yaitu HA, NA dan M2 dan analisis genetika. Hasil penelitian memperlihatkan mutasi spesifik terjadi pada virus AI tahun 2009 yaitu pada gen HA dan pada gen NA seperti yang dimiliki oleh virus AI tahun 2008 asal ayam buras. Virus yang dianalisis menunjukkan bahwa mutasi yang terjadi bersifat non sinonim dan tidak disebabkan karena tekanan vaksinasi. Enam virus tahun 2009 yang dianalisis juga menunjukkan resisten terhadap amantadin yang ditunjukkan oleh adanya mutasi pada protein M2.

Kata Kunci: Mutasi, Virus AI Subtipe H5N1, Protein Membran

PENDAHULUAN

Virus influenza adalah virus yang mempunyai materi genetik RNA untai tunggal berpolaritas negatif dengan genom bersegmen. Virus influenza A dan B mempunyai delapan segmen, sedangkan virus influenza C mempunyai tujuh segmen (MCGEOCH *et al.*, 1976; DESSELBERGER *et al.*, 1980). Segmen-segmen tersebut secara bebas diselubungi oleh nukleoprotein dan dihubungkan dengan polimerase kompleks. Partikel virus terdiri dari RNA viral (vRNA), Nukleoprotein (NP) dan kompleks polimerase yang disebut dengan partikel ribonukleoprotein (RNP) (KATES *et al.*, 1962).

Tiga protein virus terdapat dalam membran adalah dua glikoprotein permukaan (*spike*) yaitu hemagglutinin (HA) dan neuraminidase (NA) dan protein *membran-channel*, (M2) (ZEBEDEE dan LAMB, 1988). Haemagglutinin (HA) homotrimer yang mempunyai aktifitas pengikatan terhadap reseptor dan aktivitas fusi membran yang diaktivasi dengan pH rendah dalam endosom selama masuknya virus ke dalam sel (WHARTON *et al.*, 1990). Neuraminidase homotetramer yang mempunyai aktifitas menghancurkan reseptor untuk membebaskan virus baru dari permukaan sel yang terinfeksi (COLMAN, 1989), sedangkan M2 adalah protein membran protein yang memiliki domain

membran-spanning yang juga menyediakan sinyal untuk transpor ke permukaan sel yang berbentuk tetramer membran *channel* (SUGRUE dan HAY, 1991; PINTO *et al.*, 1992; WEBSTER *et al.*, 1992).

Setelah lebih dari enam tahun bersirkulasi di Indonesia, karakter molekuler virus AI di Indonesia telah mengalami perubahan. Virus AI yang diisolasi dari unggas yang divaksinasi AI mengalami *antigenic drift* yang cukup ekstenstif jika dibandingkan dengan virus AI yang diisolasi dari ayam yang tidak divaksinasi AI (DHARMAYANTI, 2009). Penelitian DHARMAYANTI (2009) mengidentifikasi adanya motif tertentu yang dimiliki oleh virus AI yang kemungkinan dapat ditularkan ke manusia. Mutasi yang diamati pada virus AI sepanjang tahun 2003-2008 adalah mutasi non sinonim yang terjadi pada gen HA dan M. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter mutasi pada tiga protein membran yaitu HA, NA dan M pada virus AI sub tipe H5N1 yang diisolasi pada tahun 2009. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan gambaran dan informasi terbaru tentang karakter genetik virus AI sub tipe H5N1 tahun 2009.

MATERI DAN METODE

Virus AI

Virus AI sub tipe H5N1 yang digunakan untuk studi ini dipropagasi pada telur *specific pathogen free* (SPF) berembrio umur 9-11 hari. Cairan alantois hasil panen dari telur SPF berembrio yang telah diinfeksi, diuji lebih lanjut yaitu dikarakterisasi dengan RT-PCR dan sekuensing.

Ekstraksi RNA dan RT-PCR

Ekstraksi RNA virus yang berasal dari cairan alantois terinfeksi dilakukan dengan menggunakan QIAmp RNA viral mini kit (Qiagen) (DHARMAYANTI, 2009). Reaksi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan Superscript III one step RT-PCR system (Invitrogen).

Sekuensing DNA

Strategi dan set primer untuk mengamplifikasi gen HA dan M sesuai dengan HOFFMAN (2003); KOMADINA (2007, komunikasi pribadi) dan DHARMAYANTI (2009). Fragmen DNA hasil amplifikasi dipurifikasi dengan *QIAquick PCR purification* (Qiagen). Reaksi sekuensing dilakukan dengan menggunakan reagen Big Dye Terminator v 3.1 (Applied Biosystem) dan DNA sekuensing dilakukan dengan mesin Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystem). Hasil sekuensing dianalisis dengan menggunakan Finch TV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) dan pembuatan *multiple alignment* dengan menggunakan BioEdit, versi 7 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Pohon filogenetika dihasilkan dengan MEGA 4 (<http://www.megasoftware.net>).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak enam virus yang berhasil dianalisis menunjukkan bahwa hasil analisis genetika pada gen HA1 memperlihatkan bahwa virus AI tahun 2009 mempunyai mutasi asam amino yang tidak dimiliki oleh virus AI tahun sebelumnya (2003-2008). Mutasi asam amino terjadi pada urutan 9 yaitu asam amino A menjadi S (A9S). Mutasi lainnya adalah asam amino pada urutan 69 yaitu asam amino R menjadi K (R69K) dan asam amino R menjadi M pada posisi 205 (R205M). Mutasi yang terjadi adalah mutasi non sinonim (Gambar 1). Protein HA virus influenza mempunyai glikoprotein trimerik yang mempunyai 3-9 *N-linked glycosylation sequons* perunit, tergantung pada galur virus (SCHULZE, 1997). Pada penelitian ini virus mempunyai sebanyak 7 tempat glikosilasi pada protein HA1 yaitu pada posisi 11, 23, 84, 154, 165, 193 dan 286 (Gambar 1). Hal berbeda jika dibandingkan dengan virus yang mengalami *antigenic drift* yaitu virus yang

Tabel 1. Isolat AI sub tipe H5N1 yang digunakan pada penelitian

Nama Isolat	Patogenesitas	Asal sampel
A/Chicken/West Java/Bgr-Cmngg/2009	Mortalitas tinggi	Wabah unggas, disekitar kasus manusia terinfeksi H5N1
A/Chicken/West Java/Smi-Dmn/2009	Mortalitas tinggi	Wabah unggas
A/Chicken/West Java/Smi-Endo/2009	Mortalitas tinggi	Wabah unggas
A/Chicken/West Java/Smi-Mgg/2009	Mortalitas tinggi	Wabah unggas
A/Chicken/West Java/Indramayu-Indr/2009	Mortalitas tinggi	Wabah unggas
A/Chicken/West Java/Smi-Emn/2009	Mortalitas tinggi	Wabah unggas

diisolasi dari unggas yang divaksinasi (Smi-Hj18/07, Smi-Sud1/07, SMI-M1/08, SMI-M6/08, SMI- Biot/08 termasuk virus Pwt-Wij/06 dan Smi-Pat/06) hanya memiliki sebanyak 4 tempat glikosilasi karena tidak mempunyai tempat glikosilasi pada posisi 84, 165 dan 193 (DHARMAYANTI, 2009). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa seluruh virus AI 2009 yang dianalisis tidak mengalami penurunan atau peningkatan jumlah glikosilasi sehingga kemungkinan tidak menciptakan populasi virus yang mengalami peningkatan afinitas terhadap reseptor dan tidak menghasilkan populasi virus yang lebih tahan terhadap netralisasi daripada parentalnya (SCHULZE, 1997), tidak seperti halnya virus yang diisolasi dari ayam yang divaksinasi AI yang telah terbukti lebih tahan terhadap netralisasi daripada induknya. Berdasarkan sekuen asam amino pada *cleavage site* HA, enam virus yang digunakan pada penelitian ini mempunyai rangkaian asam amino yang menandakan virus termasuk kelompok *highly pathogenic* dan mempunyai substitusi pada posisi -6 protein HA1 yaitu Arginin (R)→Serin (S) (Gambar 1). Variasi pada motif dapat terjadi berkaitan dengan geografi asal isolat, tidak dihubungkan dengan perubahan virulensi dan infeksi pada manusia (WRITTING COMMITTEE OF SECOND WORLD ORGANIZATION CONSULTATION, 2008). Virus yang dianalisis pada penelitian ini tidak mengalami mutasi pada asam amino posisi 222 dan 224 sehingga masih mengenal *avian receptor* ($\alpha 2,3$) dan belum mengenal *human receptor* ($\alpha 2,6$) (STEVENS *et al.*, 2006). Substitusi sebuah asam amino pada protein hemagglutinin dapat mengubah spesifisitas pengikatan *sialyl-linkage* Neu5Ac2-3Gal (Ac2-3) menjadi Neu5Ac2-3Gal (Ac2-6) atau sebaliknya. Substitusi Ser205Tyr yang terletak pada antigenik D dari hemagglutinin virus H3 (jaraknya jauh dari *reseptor binding site*), menghasilkan perubahan spesifisitas pengikatan reseptor dari 2-3 ke 2-6. Perubahan Leu226Gln pada *pocket receptor binding site* juga mengubah spesifisitas pengikatan reseptor 2-6 ke 2-3. Perubahan ini sangat penting karena berpengaruh pada kemampuan infeksi virus pada inangnya. Pada penelitian ini, dikarenakan virus masih mengenal *avian receptor* (Ac2-3) sehingga infeksi pada manusia kemungkinan tertular dari unggas yang terlebih dahulu terinfeksi virus H5N1.

Pada *multiple alignment* protein NA menunjukkan kekhasan virus AI 2009 yaitu perubahan asam amino pada posisi 163 yaitu V menggantikan L (V143L). Selain itu mutasi juga terjadi pada posisi 189 yaitu asam amino S digantikan oleh G (S189G), asam amino E digantikan oleh asam amino K pada posisi 259 (E259K), dan asam amino G menggantikan E (G382E) (Gambar 2). Tiga mutasi ini serupa dengan virus AI tahun 2008 yang diisolasi dari ayam buras tanpa vaksinasi AI yaitu isolat A/Ck/West Java/Smi-Acl/08

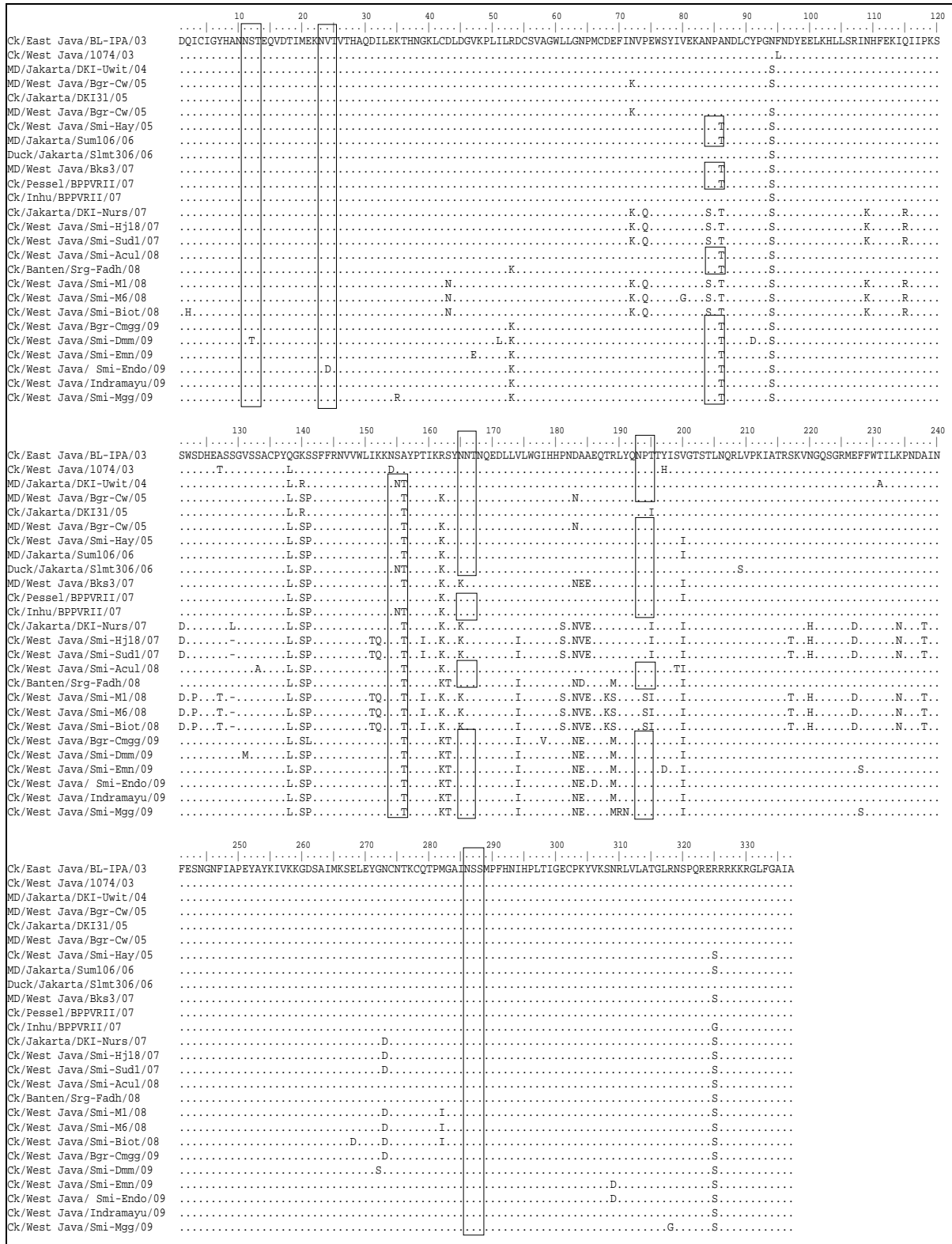
dan A/Ck/Banten/Srg-Fadh/08. Pada protein NA, semua virus H5N1 Indonesia mempunyai delesi 20 asam amino pada regio *stalk* yaitu pada posisi 48-67. Tempat glikosilasi pada regio *stalk* dari protein neuraminidase berperan dalam menjaga struktur tetramer dari protein (LUO *et al.*, 1993). Semua virus pada penelitian ini tidak mempunyai tempat glikosilasi pada *stalk* protein neuraminidase karena delesi di daerah ini, sehingga pada protein NA hanya memiliki 3 tempat glikosilasi yaitu pada posisi 88, 146 dan 235. Delesi pada daerah ini akan meningkatkan retensi virion pada membran plasma (MATROSOVICH *et al.*, 1999).

Mutasi yang terjadi tidak seperti virus yang diisolasi dari ayam yang divaksinasi AI secara intensif dan tidak terjadi pada epitop pengenalan antibodi (DHARMAYANTI, 2009), sehingga besar kemungkinan mutasi yang terjadi bukan akibat tekanan vaksinasi sehingga asal virus diperkirakan adalah virus yang bersirkulasi di lingkungan. Mutasi asam amino pada protein permukaan virus yaitu HA dan NA yang terjadi pada virus tahun 2009 mengindikasikan bahwa virus terus berusaha beradaptasi dengan lingkungan sekitarnya.

Indikasi adanya mutasi pada gen NA adalah hal baru, karena sebelumnya DHARMAYANTI (2009) tidak menemukan adanya mutasi pada gen NA pada virus-virus tahun 2003-2008, sehingga paparan mutasi hanya terbatas pada gen HA saja serta beberapa virus memperlihatkan mutasi pada gen internal. Hal ini tentunya sangat menarik karena paparan mutasi pada virus AI tahun 2009 telah mengakibatkan perubahan asam amino pada glikoprotein permukaan virus yaitu Neuraminidase selain Hemagglutinin. Dengan perkataan lain bahwa hasil penelitian ini menggambarkan virus AI sedang dan terus bermutasi.

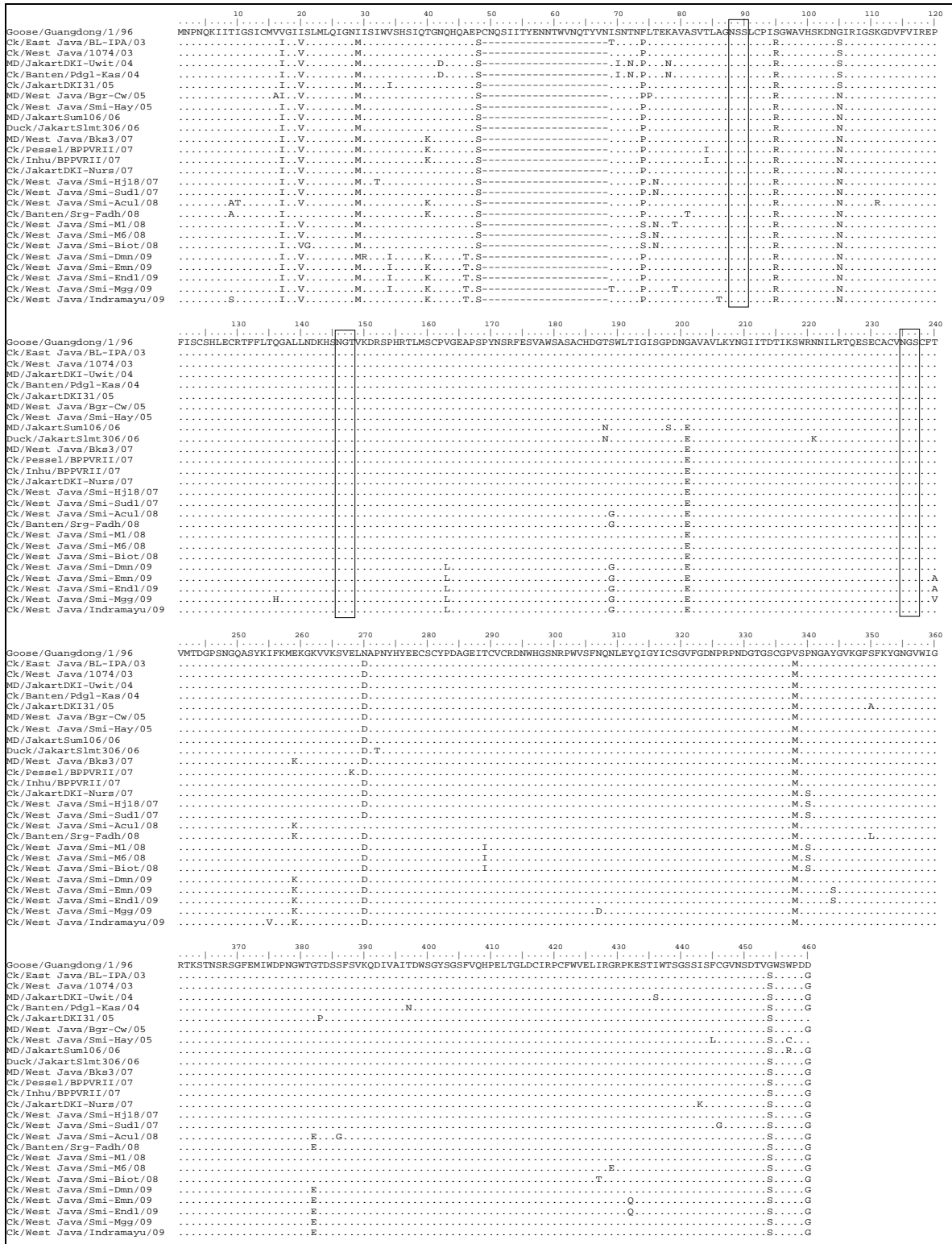
Hasil analisis filogenetika, enam virus 2009 yang dianalisis pada aras gen HA (Gambar 3) dan NA (Gambar 4) menunjukkan bahwa virus tahun 2009 membentuk kelompok tersendiri meskipun masih dalam kelompok besar virus AI sub tipe H5N1 asal Indonesia, dan berbeda dengan kelompok virus yang mengalami *antigenic drift* yang berasal dari flock ayam yang divaksinasi AI.

Substitusi asam amino tunggal pada asam amino 26(Leu→Phe), 27 (Val→Ala atau Thr), 30 (Ala→Thr atau Val), 31 (Ser→Asn atau Arg) dan 34 (G→E) dalam domain transmembran M2 diimplikasikan dengan hilangnya sensitivitas bloker M2 yang mengakibatkan resisten terhadap amantadin (HAY *et al.*, 1985; PINTO *et al.*, 1992; SUZUKI *et al.*, 2003). Analisis pada protein M2 memperlihatkan bahwa enam virus tahun 2009 yang digunakan pada penelitian ini memiliki substitusi pada asam amino posisi 27 yaitu A (Val→Ala; V27A) yang menunjukkan virus tersebut resisten terhadap amantadin (Tabel 2). DHARMAYANTI *et al.* (2010) dalam penelitiannya memperlihatkan



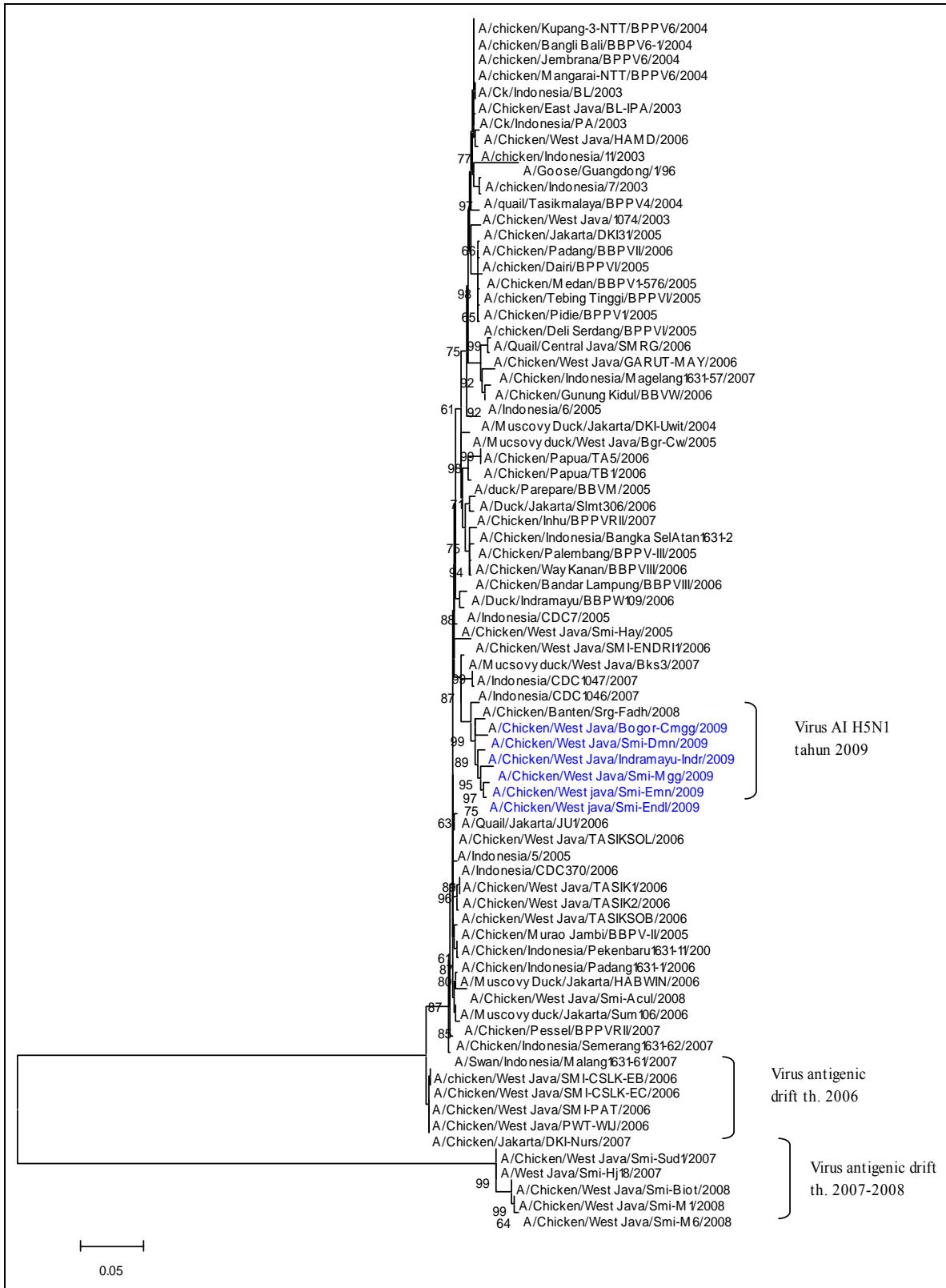
Gambar 1. Multiple alignment protein HA1 virus AI subtype H5N1 tahun 2003-2009

Keterangan: Tempat glikosilasi ditandai dengan kotak tertutup dan residu asam amino didaerah *cleavage site* HA ditunjukkan dengan kotak tertutup dengan warna abu-abu. Penomoran asam amino berdasarkan virus BL-IPA/03. Ck : Chicken; MD : Muscovy duck



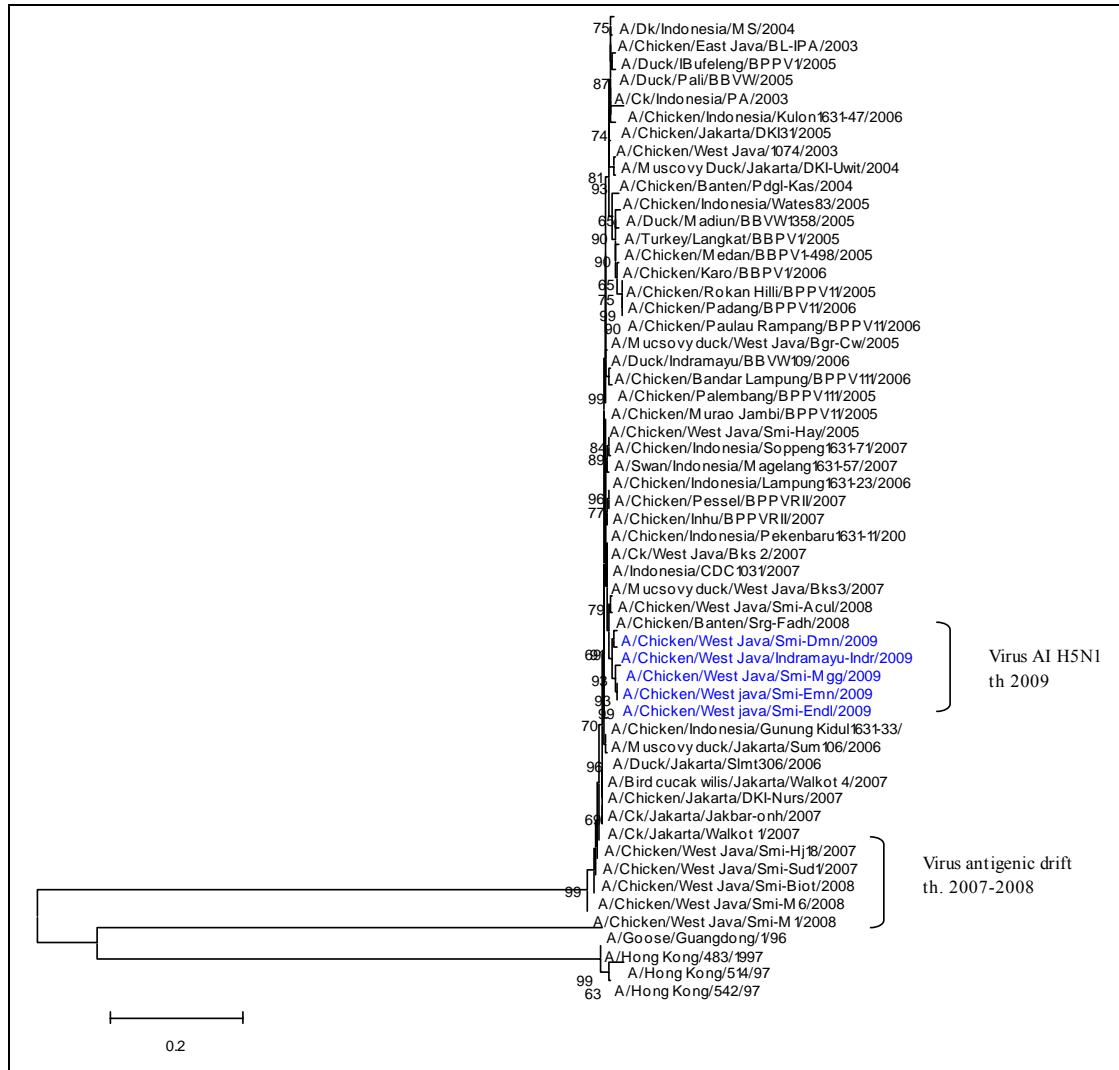
Gambar 2. Multiple alignment protein NA virus AI sub tipe H5N1 tahun 2003-2009

Keterangan: Glikosilasi ditandai dengan kotak tertutup. Delesi 20 asam amino ditunjukkan dengan kotak tertutup warna abu-abu. Penomoran asam amino berdasarkan virus Gs/Guangdong/1/96. Ck : Chicken; Md : Muscovy duck



Gambar 3. Filogenetika virus AI sub tipe H5N1 pada aras gen HA1

Keterangan: Virus yang berhasil diisolasi pada penelitian ditandai dengan warna biru. Nukleotida yang dianalisis pada aras gen HA1 adalah posisi 49-1059



Gambar 4. Filogenetika virus AI sub tipe H5N1 pada aras gen NA

Keterangan: Virus yang berhasil diisolasi pada penelitian ditandai dengan warna biru. Nukleotida yang dianalisis pada aras gen NA adalah posisi 1-1157.

Tabel 2. Posisi asam amino yang bertanggung jawab terhadap sensitivitas amantadin pada protein M2

Virus	Posisi asam amino pada protein M2				
	26	27	30	31	34
A/Chicken/West Java/Bgr-Cmgg/2009	L	A	A	S	G
A/Chicken/West Java/Smi-Dmn/2009	L	A	A	S	G
A/Chicken/West Java/Smi-Endo/2009	L	A	A	S	G
A/Chicken/West Java/Smi-Mgg/2009	L	A	A	S	G
A/Chicken/West Java/Indramayu-Indr/2009	L	A	A	S	G
A/Chicken/West Java/Smi-Emn/2009	L	A	A	S	G

bahwa dari 147 data sekuen asam amino M2 virus influenza asal Indonesia yang dianalisis, diketahui bahwa sebanyak 62,58% atau 92 isolat virus influenza H5N1 di Indonesia telah mengalami resistensi terhadap amantadin, bahkan 10 virus diantaranya mempunyai mutasi ganda yaitu pada posisi V27A dan S31N. Data penelitian pada studi ini memperkuat penelitian DHARMAYANTI *et al* (2009) yaitu virus AI subtipe H5N1 di Indonesia mengindikasikan terdapatnya peningkatan resistensi terhadap amantadin.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa virus AI subtipe H5N1 yang dianalisis pada penelitian ini menunjukkan bahwa virus AI di Indonesia terus bermutasi terutama pada protein membran virus. Mutasi yang terjadi adalah spesifik pada virus AI tahun 2009 yaitu pada gen HA dan pada gen NA, virus AI tahun 2009 memiliki mutasi yang spesifik seperti yang dimiliki oleh virus AI tahun 2008 asal ayam buras. Virus yang dianalisis menunjukkan bahwa mutasi yang terjadi bersifat non sinonim dan tidak disebabkan karena tekanan vaksinasi. Enam virus tahun 2009 yang dianalisis juga menunjukkan resisten terhadap amantadin yang ditunjukkan oleh adanya mutasi pada protein M2. Meskipun wabah avian influenza subtipe H5N1 pada unggas telah berkurang, namun virus ini terus bermutasi sehingga monitoring sirkulasi virus ini masih harus terus dilakukan untuk mengetahui kemungkinan peningkatan keganasan virus serta memperbaharui seed vaksin yang sesuai dengan virus yang bersirkulasi di lapangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Bapak Nana Suryana, SE dan Teguh Suyatno, Amd atas bantuan teknisnya. Terima kasih juga diucapkan kepada Drh Endri Baharianto atas kontribusinya. Penelitian ini didanai oleh APBN-2009, Badan LitBang Pertanian, Kementerian Pertanian.

DAFTAR PUSTAKA

COLMAN, P.M. 1989. Neuraminidase: Enzyme and antigen. In: *The Influenza Viruses*. R.M. Krug (ed). Plenum Press. New York. pp. 175-218.

DESSELBERGER, U., V.R. RACAINELLO, J.J. ZAZRA and P. PALASE. 1980. The 3' and 5' terminal sequences of influenza A,B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementary. *Gene*. 8: 315-328.

DHARMAYANTI, N.L.P.I. 2009. Perubahan Genom Dan Karakter Virus Avian Influenza Subtipe H5N1 Pada Unggas di Indonesia. Disertasi Program Doktor Ilmu

Biomedik. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta.

- DHARMAYANTI, N.L.P.I., F. IBRAHIM and A. SOEBANDRIO. 2010. Amantadine resistant of Indonesian influenza H5N1 subtype virus during 2003-2008. *Microbiol. Indones*. 5. 1: 11-16.
- HAY, A.J., A.J. WOLSTENHOLME, J.J. SKEHEL and M.H. SMITH. 1985. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J*. 4: 3021-3024.
- HOFFMANN, E., J. STECH, Y. GUAN, R.G. WEBSTER and D.R. PEREZ. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol*. 146: 2275-2289.
- KATES, M., A.C. ALLISON, D.A. TYRELL, and A.T. JAMES. 1962. Origin of lipids in influenza virus. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 27: 293-301.
- KOMADINA, N. 2007. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza Centre, 45 Poplar Rd., Parkville, Vic 3052, Australia.
- LUO, G., J. CHUNG and P. PALESE. 1993. Alterations of the stalk of the influenza virus neuraminidase: deletions and insertions. *Virus Res*. 29: 141-153.
- MATROSOVICH, M., N. ZHOU, Y. KAWAOKA and R. WEBSTER. 1999. The surface glycoprotein of H5 influenza viruses isolated from human, chickens and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol*. 73: 1146-115.
- MCGEOCH, D., P. FELLNER and C. NEWTON. 1976. Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 73: 3045-3049.
- PINTO, L.H., L.J. HOLSINGER and R.A. LAMB. 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*. 69: 517-528.
- SCHULZE, I.T. 1997. Effect of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *J. Infect. Dis*. 176: S24-28.
- STEVENS, A., O. BLIXT, T.M. TUMPEY, J.K. TAUBENBERGER, J.C. PAULSON and I.A. WILSON. 2006. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*. 312: 404-410.
- SUGRUE, R.J. and A.J. HAY. 1991. Structural characteristics of M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology*. 180: 617-24.
- SUZUKI, H., R. SAITO, H. MASUDA, H. OSHITANI, M. SAITO and I. SATO. 2003. Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: Epidemiological study. *J. Infect. Chemother* 9: 195-200.
- WEBSTER, R.G., W.J. BEAN, O.T. GORMAN, T.M. CHAMBERS and Y. KAWAOKA. 1992. Evolution and Ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev*. 56: 152-179.
- WHARTON, S.A., J.A. HAY, R.J. SUGRUE, J.J. SKEHEL, W.I. WEIS and D.C. WILEY. 1990. Membrane fusion by influenza viruses and mechanism of action of amantadine. In: LAVER, W.G and G.M. AIR (eds). Use

of X-ray Crystallography in the design of antiviral agents. Academic Press. Orlando. pp. 1-12.

ZEBEDEE, S.L. and R.A. LAMB. 1988. Influenza virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J. Virol.* 62: 2762-2772.