Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2013; 15(67): 77-84

Differential diagnosis of various subtypes of influenza type A virus using RT-PCR-RFLP assay

Goodarzi Z(M.Sc)[1], Najafi A(M.Sc)[2], Saberfar E(Ph.D)[1*]

1- Applied Virology Research Center, Baqyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Molecular Biology Center, Baqyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 3 Feb 2012, Accepted: 13 Jun 2012

Abstract

Background: Influenza type A virus is one of the most important viral agents in human respiratory diseases. The genetic variability of the influenza viruses leads to the incidence of new epidemics worldwide. Hence, there is a growing need for rapid and effective new methods capable of detection and differentiation of influenza virus circulating strains. This study was done to develop a method for rapid differentiation of the subtypes of influenza type A virus.

Materials and Methods: In this experimental study, reverse-transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed using a primer set based on M gene of H1N1, H3N2, H5N1, and H9N2 influenza subtypes. Then the amplified fragments were subjected to digestion using subtype specific restriction endonuclease enzymes.

Results: The results of PCR reaction showed that the primer pair of the M gene was specific and capable of amplifying all influenza subtypes understudy. Also, different restriction fragment length polymorphism patterns (RFLP) were generated using enzyme digestion reaction on the amplified segment of M gene.

Conclusion**:** RT-PCR and RFLP analysis of the M gene can be employed as a useful method for differentiating influenza virus subtypes.

Keywords: Differential diagnosis, influenza type A virus, polymerase chain reaction**,** RFLP

*Corresponding author:
Address: Applied Virology Research Center, Baqyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: saberfar@yahoo.com

مقاله پژوهشی
مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 8 (شماره پیاپی 67)، دی 1391، 84-77

تشخیص افتراقی ساب تایپ‌های مختلف ویروس آنفلوانزا تایپ A با استفاده از روش RT-PCR-RFLP

زهرا گودرزی[1]، علی نجفی[2]، اسماعیل صابرفر[3*]

1- کارشناس ارشد ویروس شناسی، مرکز تحقیقات کاربردی ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... ، تهران، ایران
2- کارشناس ارشد بیولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... ، تهران، ایران
3- دانشیار، مرکز تحقیقات کاربردی ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... ، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 90/11/15 تاریخ پذیرش: 91/3/24

چکیده

زمینه و هدف: ویروس آنفلوانزای تایپ A یکی از مهم‌ترین عوامل ویروسی بیماری‌های تنفسی است. تغییرات ژنتیکی این ویروس باعث بروزاپیدمی‌های جدید در سرتاسر دنیا می‌شود. از این رو وجود یک تکنیک تشخیصی دقیق به منظور تشخیص سریع سویه‌های در حال گردش ضروری می‌باشد. این مطالعه با هدف به کارگیری یک روش سریع جهت افتراق ساب تایپ‌های ویروس آنفلوانزا تایپ A انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی واکنش RT-PCR با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی ژن ماتریکس بر روی ساب تایپ‌های H1N1، H3N2، H5N1 و H9N2 ویروس آنفلوانزا انجام شد. سپس محصول PCR تحت تاثیر هضم آنزیمی آنزیم‌های آندونوکلئاز اختصاصی هر ساب تایپ قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده از واکنش RT-PCR نشان داد که جفت پرایمر مربوط به ژن ماتریکس کاملا اختصاصی بوده و قادر به تکثیر کلیه ساب تایپ‌های مورد مطالعه می‌باشد. هم‌چنین در اثر واکنش هضم آنزیمی بر روی قطعات تکثیر یافته از ژن ماتریکس مربوط به ساب تایپ‌های مختلف، الگوی‌های متفاوتی بر اساس طول قطعات (RFLP) به دست آمد.

نتیجه‌گیری: واکنش RT-PCR ویروس آنفلوآنزا به همراه RFLP بر اساس ژن ماتریکس می‌تواند روش مناسبی جهت شناسایی ساب تایپ‌های مورد مطالعه ویروس آنفلوانزای تایپ A باشد.

واژگان کلیدی: تشخیص افتراقی، ویروس آنفلونزای تیپA، واکنش زنجیرهای پلی مراز، RFLP

***نویسنده مسئول**: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، مرکز تحقیقات کاربردی ویروس شناسی
Email:saberfar@yahoo.com

مقدمه

ویروس آنفلوانزای تایپ A گسترش جهانی داشته و همه ساله موجب بروز اپیدمی‌های متعددی در سراسر دنیا می‌شود. ژنوم ویروس آنفلونزای A از 8 قطعه RNA تشکیل شده است که پروتئین‌های پلی مراز (PB1, PB2, PA)، نوکلئوکپسید(NP)، هماگلوتینین(HA)، نور آمینداز(NA)، پروتئین های غیر ساختمانی و ماتریکس(M) را کد می‌کند(1). قطعه قطعه بودن ژنوم توانایی نوترتیبی ژنتیکی را به این ویروس داده است. بنابراین آلودگی هم زمان یک میزبان با دو ویروس متمایز می‌تواند منجر به پدید آمدن ویریون های هیبرید شود(5-2). بدین ترتیب تغییرات آنتی ژنی در سطح این ویروس‌ها پدیدار شده که با بروز اپیدمی و پاندمی‌های متعدد در سراسر جهان همراه است. پاندمی‌های آنفلوانزا مربوط به سال‌های 1957و 1968که به ترتیب در آسیا و هنگ کنک اتفاق افتاد، در اثر پدیده نوترکیبی ژنتیکی بین سویه‌های انسانی و پرندگان ایجاد شد. در طی این پدیده ژن‌های HA وPB1 و احیانا ژن NA سویه انسانی به وسیله‌ژن‌های مربوطه ازسویه‌های ویروس آنفلوانزای پرندگان جایگزین شده(6) و بدین ترتیب ویروس نوترکیبی پدیدار شد که حاوی آنتی ژن‌های HA و NA جدید بوده و توانایی انتقال از انسان به انسان را کسب نمود.

ویروس‌های آنفلوانزای تایپ A بر اساس تفاوت‌های ژنتیکی و آنتی ژنیتیکی گلیکوپروتین‌های سطحی، به ساب تایپ‌های متفاوتی تقسیم می‌شوند. تا به حال 15ساب تایپ بر اساس هماگلوتنین و 9 ساب تایپ بر اساس نور آمینداز شناسایی شده است(7، 8). همه ساب تایپ‌های نامبرده تا به حال از پرندگان جدا شده است اما فقط ساب تایپ‌های H2N2, H1N1 و H3N2 از جوامع انسانی جدا شده‌اند(1، 9).

پایش و مطالعه ویروس‌های آنفلوانزا در جامعه بسیار حائز اهمیت است زیرا از این طریق می‌توان ساب تایپ‌های در حال گردش را شناسایی کرده و به منظور جلوگیری از اثرات سوء اقتصادی و اجتمایی اقدامات لازم را انجام داد. هم‌چنین در موارد بروز اپیدمی وجود یک سیستم تشخیصی سریع و دقیق ضرورت پیدا خواهد کرد.

تا به حال روش‌های مولکولی متعددی به منظور شناسایی و بررسی اختلافات ژنتیکی ساب تایپ‌های مختلف ویروسی به منظور تفکیک آنها از یکدیگر به کار گرفته شده است(12-10). هدف ما از انجام این مطالعه طراحی یک سیستم سریع و ساده برای تعیین ساب تایپ‌های رایج ویروس آنفلونزای تایپ A می‌باشد که از طریق آن بتوان بر اساس تغییرات ژن M ، ویروس‌های رایج و شایع را شناسایی و تفکیک کرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، استرین‌های ویروس آنفلونزای A (A /Tehran/49/2001/(H1N1)) از واحد آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران و استرین‌های A/Tehran/82/79/(H3N2)، A/Chicken/Iran/11/99(H9N2) و A/Turkey/England/50-92/91(H5N1) از آزمایشگاه رفرانس سازمان دامپزشکی کشور دریافت شد و به عنوان استرین‌های مرجع مورد استفاده قرار گرفت.

با استفاده از کیت تجاری RNX^{TM}-Plus (سیناژن - ایران)، RNA ویروس از 150-100 میکرولیتر سوسپانسیون ویروسی، طبق دستورالعمل کیت استخراج گردید و در نهایت RNA استخراج شده در 50 میکرولیتر بافرEDTA به غلظت 1 میلی مولار جدا شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

تکثیر ژن M ویروس‌های مورد مطالعه در طی دو مرحله واکنش RT-PCR انجام شد(10). واکنش رونویسی معکوس در حجم کلی 20 میکرولیتر انجام شد که شامل200 نانوگرم/ میکرولیتر RNA استخراج شده، 10 پیکو مولار پرایمر پیشرو، dNTP با غلظت 10میلی‌مولار، بافر 5x، 20 واحد آنزیم Ribonulease Inhibitor و 40 واحد آنزیم رونوشت بردار معکوس بوده و به مدت 45 دقیقه در دمای 42 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

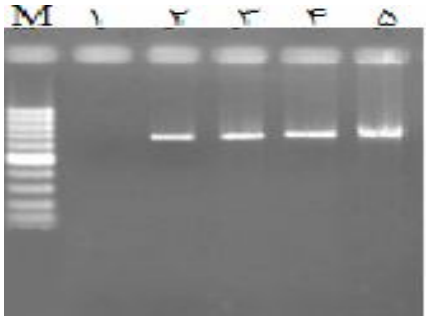
در این مطالعه از جفت پرایمر P1:5´-CTCATGGAATGGCTAAAGACA-3´و-P2:5´ CGATCAAGAATCCACAATATC-3´ استفاده گردید (5). پرایمرهای مورد استفاده قطعه‌ای از ژن M را تکثیر می‌نمایند. این ناحیه از ژن ماتریکس، به صورت تقریباً حفاظت شده در تمامی ویروس‌های آنفلونزای A موجود بوده و می‌تواند جهت جدا سازی اکثر ساب تایپ‌های این ویروس به خوبی مورد استفاده قرار گیرد. ویژگی و اختصاصیت این پرایمرها با استفاده از نرم افزارهای مولکولی BLAST و Oligo و دیگر نرم افزارهای بیوانفورماتیکی که به صورت Online در اینترنت در دسترس هستند، مورد بررسی قرار گرفت. نقشه برشی منطقه تکثیر شده در هر چهار ساب تایپ توسط نرم افزارGeneious مشخص گردید و پس از ارزیابی آنزیم‌های برش دهنده مختلف بر روی ساب تایپ‌های مورد مطالعه، آنزیم‌های برشی HindII , ScaI, AgeI و Csp6I برای هر ساب تایپ انتخاب گردید. سپس واکنش هضم آنزیمی قطعات DNA تکثیر یافته مربوط به هر ساب تایپ طبق دستورالعمل جدول 1 انجام گرفت. در نهایت قطعات به دست آمده روی ژل آگارز 2 درصد منتقل گردید و بعد از رنگ آمیزی با ژل اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده گردید.

جدول 1. مواد لازم برای واکنش هضم آنزیمی

مواد	حجم	دما	زمان
محصولPCR	6 میکرولیتر	$65^{\circ C}$	3 ساعت
آنزیم برش دهنده	1 میکرولیتر		
بافر (10x)	2/5 میکرولیتر		
آب مقطر	15/5 میکرولیتر		
حجم نهایی	25 میکرولیتر		

یافته ها

در این مطالعه از استرین‌های ویروسی A /Tehran/49/2001/(H1N1) ،A/Tehran/82/79/(H3N2) و A/Chicken/Iran/11/99(H9N2) به عنوان استرین‌های مرجع استفاده گردید. از تکثیر ژن M مربوط به ساب تایپ‌های H9N2، H5N1، H3N2،H1N1 و الکتروفروز محصول RT-PCR، قطعه‌ای به طول 699 جفت باز به دست آمد(شکل 1).



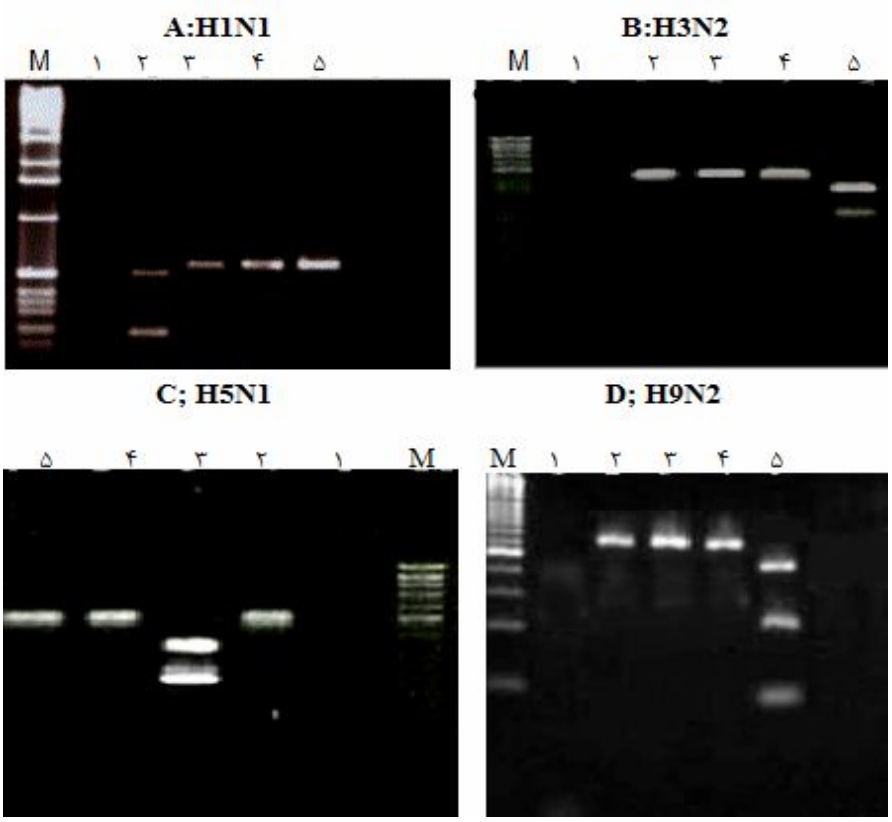
شماره1. ژل الکتروفرزمحصول RT-PCR
M: مارکر 100کیلوبازی، ستون1: کنترل منفی، ستون 2: ژن M ساب تایپ H1 ، ستون 3: ژن M ساب تایپ H3 ، ستون 4: ژن M ساب تایپ H5 ، ستون 5: ژن M ساب تایپ H9. (طول همه قطعات699جفت باز)

نتایج برش آنزیمی

نتیجه برش آنزیمی قطعه M تکثیر یافته مربوط به ساب تایپ‌های H9N2، H5N1، H3N2،H1N1 با هر یک از آنزیم‌های HindIII، ScaI ، AgeI، Csp6I مشخص شد. قطعه M در ساب تایپ H1N1 توسط آنزیم HindIII در جایگاه A'AGCT_T(181) برش خورده و دوقطعه به طول‌های 181و 518 جفت باز حاصل شد. قطعه هدف در ساب تایپ H3N2 توسط آنزیم ScaI توالی AGT'ACT را در جایگاه 555 برش داده و دو قطعه به طول‌های 555 و 144 جفت باز ایجاد شد. قطعه M در ساب تایپ H5N1 به وسیله آنزیم AgeI توالی A'CCGG_T در جایگاه 238 برش خورده و دو قطعه به طول‌های 238و 461 جفت باز حاصل شد و در نهایت آنزیم Csp6I، قطعه مورد مطالعه در ساب تایپ H9N2، توالی G'TA_C را در دو جایگاه514 و 415برش داده و بدین ترتیب سه قطعه به طول‌های 415 ، 99 و 185 جفت باز ایجاد شد(جدول 2 و شکل 2).

جدول 2. آنزیم های اختصاصی برش دهنده ساب تایپ های ویروس آنفلوانزا تایپ A

ساب تایپ	آنزیم های برش دهنده اختصاصی ساب تایپ	محل برش	طول قطعات
H1N1	HindIII	A'AGCT_T	181و 518 جفت باز
H3N2	ScaI	AGT'ACT	555 و 144 جفت باز
H5N1	AgeI	A'CCGG_T	238و 461 جفت باز
H9N2	Csp6I	G'TA_C	415 ، 99 و 185 جفت باز



شکل 2. الگوی هضم آنزیمی ژن M مربوط به ساب تایپ های H1N1، H3N2، H5N1 و H9N2 به وسیله آنزیم های اختصاصی نوع ساب تایپ.

A; M : مارکر 100 کیلو بازی، ستون 1: کنترل منفی، ستون 2: ژن M ساب تایپ H1 بعد از هضم آنزیمی، ستون 3: ژن M ساب تایپ H3 (699 bp)، ستون 4: ژن M ساب تایپ H5 (699bp)، ستون 5: ژن M ساب تایپ H9 (699bp)

B; M : مارکر 100کیلوبازی، ستون 1: کنترل منفی، ستون 2: ژن Mساب تایپ H1(699bp)، ستون 3: ژن M ساب تایپ H9 (699bp)، ستون 4: ژن M ساب تایپ H5 (699bp)، ستون 5: ژن M ساب تایپ H3 بعد ازهضم آنزیمی.

C; M : مارکر 100کیلوبازی، ستون 1: کنترل منفی، ستون 2: ژن Mساب تایپ H1(699bp)، ستون 3: ژن M ساب تایپ H5 بعد از هضم آنزیمی، ستون 4 : ژن M ساب تایپ H3(699bp)، ستون 5: ژن M ساب تایپ H9 (699 bp).

D; M : مارکر 100کیلوبازی، ستون 1: کنترل منفی، ستون 2: ژن Mساب تایپ H1(699bp)، ستون 3: ژن M ساب تایپ H3(699bp)، ستون 4: ژن M ساب تایپ H5 (699bp)، ستون 5: ژن M ساب تایپ H9 بعد ازهضم آنزیمی.

بحث

علیرغم سرمایه‌گذاری‌های عظیم تحقیقاتی و ساخت واکسن‌های متعدد علیه ویروس آنفلونزا، هنوز بیماری ناشی از این ویروس کنترول نشده است. هر چند سال یک بار نوع جدیدی از ویروس آنفلونزا در اثر پدیده

نوترکیبی پدیدار شده به سرعت گسترش می‌یابد به نحوی که قبل از هر گونه اقدامی موجب همه‌گیری جهانی می‌شود و زندگی میلیون‌ها نفر را به خطر می‌اندازد(13).

تشخیص زود هنگام و تعیین خصوصیت واریانت‌های جدید آنفلونزا یکی از اهداف سازمان بهداشت جهانی می‌باشد. از این رو، دست یابی به تست‌های سریع که بتواند ویروس‌های جدید و غیر معمول را شناسایی کند ضرورت پیدا می‌کند. از آنجا که روش الگوی‌های متفاوت طول قطعات ناشی از هضم آنزیمی (RFLP) از لحاظ هزینه و سرعت انجام کار به صرفه می‌باشد در این پروژه از این تکنیک برای افتراق ساب تایپ‌های اصلی و مهم ویروس آنفلوآنزا یعنی H1N1، H3N2، H5N1 و H9N2 استفاده شده است. علت این که ما در این پروژه قطعه ژنی M را به عنوان هدف انتخاب کردیم این است که این قطعه نسبت به سایر ژن‌های ویروس آنفلوانزا کمتر دستخوش تغییرات و موتاسیون‌های نقطه‌ای قرار می‌گیرد(14). هم‌چنین سایت‌ها و نواحی منحصر به فردی در این ژن وجود دارد که احتمالاً در تروپیسم ویروس به میزبان نقش داشته و در هر یک از ساب تایپ‌های آنفلوآنزا تقریباً ثابت هستند(14، 15). از این رو همان طور که در قسمت نتایج دیده شد هر یک از ساب تایپ‌ها دارای یک نقشه برشی آنزیمی مخصوص به خود می‌باشد. به این ترتیب می‌توان با انتخاب آنزیم مناسب، از این تکنیک برای تشخیص اختصاصی ساب تایپ‌های ویروس آنفلونزا استفاده نمود.

اگرچه میزان تغیرات ژنتیکی ژن M ویروس آنفلونزا نسبت به ژن‌های HA و NA پایین است(6). ولی در طول زمان توالی این ژن ممکن است دست خوش تغییرات گردد. به همین دلیل لازم است که در انتخاب پرایمر و آنزیم‌های آندونوکلئاز دقت شود. به هر حال از مزایای روش مورد استفاده این است که از ناحیه حفاظت شده ژن M به منظور تکثیر ویروس استفاده شده است در نتیجه می‌توان طیف وسیعی از ویروس‌های آنفلونزای در گردش را شناسایی کرد و هم‌چنین با استفاده از این تست می‌توان ساب تایپ ویروس‌های جدا شده از بیماران را بر اساس ژن M تعیین کرد. بنابراین با انجام این تست در آزمایشگاه‌ها می‌توان با هزینه کمتر ویروس جدا شده را مشخص کرد.

جدا سازی ساب تایپ‌های مختلف ویروس آنفلونزا بر اساس انواع روش‌ها مثل کشت سلول و روش‌های مولکولی از جمله سکانسینگ و multiplex RT-PCR(10) امکان پذیر است. کشت سلول زمان بر است و در موا قعی که شناسایی سریع نوع ویروس اهمیت دارد فاقد ارزش است. روش سکانسینگ پر هزینه بوده و نمی‌توان از آن به عنوان روش روتین برای شناسایی ویروس‌های در چرخش استفاده کرد. تکنیک multiplex RT-PCR، روشی است که به طراحی هم‌زمان چند پرایمر نیاز داشته و در نتیجه بهینه کردن شرایط PCR با وجود پرایمرهای مختلف کار سختی است. روش‌های سریع، مانند ایمونوفلورسانس و آنزیم ایمونواسی که برای تشخیص ویروس‌های آنفلونزا در نمونه‌های بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند از اختصاصیت و حساسیت متغیری برخوردار هستند.

همان گونه که قبلاً ذکر گردید ویروس آنفلوآنزا دارای تغییرات ژنتیکی زیادی می‌باشد که این موضوع باعث شده است تا ساب تایپ‌های متعددی از این ویروس مهلک و خطراک پدیدار گردد. موتاسیون‌های ایجاد شده را می‌توان علاوه بر روش سکانسینگ با استفاده از تکنیک برش آنزیمی مورد ارزیابی و تشخیص قرار داد.

مطالعات مشابه دیگری بر اساس این روش برای تفکیک سویه‌ها و زیر گونه‌های عوامل میکروبی در داخل و خارج کشور انجام شده است(19-16). در مورد ویروس آنفلوآنزا در داخل کشور از این روش تا به حال استفاده نشده ولی در خارج از کشور مطالعات مشابه جهت تشخیص ساب تایپ‌ها و هم‌چنین جهت تشخیص ساب تایپ‌های مقاوم به دارو و افتراق آنها از ساب تایپ‌های حساس به دارو انجام گردیده است(16، 17، 20). همگی این تست‌ها و نتایج حاصل از آنها حاکی از مورد تائید و کارآمد بودن روش RT-PCR-RFLP می‌باشد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که واکنش RT-PCR-RFLP جهت تشخیص ساب تایپ‌های ویروس آنفلونزا بر اساس ژن M ، روش آسان و نسبتاً کم هزینه‌ای بوده و از آن می‌توان جهت تشخیص و پایش ویروس‌های آنفلونزا در سطح کشور استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کلیه همکاران محترم آزمایشگاه ویروس شناسی کاربردی پژوهشگاه دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تشکر و قدر دانی می‌نمایند. این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی به شماره 404-86 و با حمایت مالی معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله انجام شده است.

منابع

1. Russell R, Gamblin S, Haire L, Stevens D, Xiao B, Ha Y, et al. H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes. Virology. 2004; 325(2): 287-96.
2. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiological reviews. 1992; 56(1):152-79.
3. Guan Y, Peiris J, Lipatov A, Ellis T, Dyrting K, Krauss S, et al. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002; 99(13):8950-5.
4. Sampath R, Russell KL, Massire C, Eshoo MW, Harpin V, Blyn LB, et al. Global surveillance of emerging Influenza virus genotypes by mass spectrometry. PLoS One. 2007;2(5):e489.
5. Fereidouni SR, Harder TC, Starick E. Rapid pathotyping of recent H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses and of H5 viruses with low pathogenicity by RT-PCR and restriction enzyme cleavage pattern (RECP). Journal of virological methods. 2008; 154(1):14-9.
6. Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. Journal of Virology. 1989; 63(11): 4603-8.
7. Xie Z, Pang Y, Liu J, Deng X, Tang X, Sun J, et al. A multiplex RT-PCR for detection of type A influenza virus and differentiation of avian H5, H7, and H9 hemagglutinin subtypes. Molecular and cellular probes. 2006;20(3):245-9.
8. Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. Journal of virological methods. 2001; 97(1):13-22.
9. Webster R, Shortridge K, Kawaoka Y. Influenza: interspecies transmission and emergence of new pandemics. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2006; 18(4):275-9.
10. Saberfar E, Forghani-Fard MM, Mosavi M. Multiplex reverse transcriptase-PCR assay for typing and subtyping of influenza A (H5 & H9) virus in Iran. Iranian Biomedical Journal. 2007; 11(2):69-74.
11. Klimov AI, Cox NJ. PCR restriction analysis of genome composition and stability of cold-adapted reassortant live influenza vaccines. Journal of virological methods. 1995; 52(1): 41-9.
12. Sakamoto S, Kino Y, Oka T, Herlocher ML, Maassab HF. Gene analysis of reassortant influenza virus by RT-PCR followed by restriction enzyme digestion. Journal of virological methods. 1996; 56(2): 161-71.
13. Ojo S, Guffy M. Facial-digital syndrome in purebred angus cattle. Veterinary medicine, small animal clinician: VM, SAC. 1975; 70(1):28-9.
14. Ito T, Gorman OT, Kawaoka Y, Bean WJ, Webster RG. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. Journal of Virology. 1991;65(10):5491-8.
15. Yuki F, Akira S, Taro K, Hitoshi O. Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale

sequence analysis. Virology Journal.2009;6:67-8.
16. Cooper LA, Subbarao K. A simple restriction fragment length polymorphism-based strategy that can distinguish the internal genes of human H1N1, H3N2, and H5N1 influenza A viruses. Journal of clinical microbiology. 2000; 38(7):2579-83.
17. Park K, Lee M, Ryu J, Park Y. Evolutionary stasis of M1 gene of human influenza A viruses and the possibility of their subtyping by restriction analysis of M1 gene polymerase chain reaction product. Acta virologica. 1997;41(4):231-9.
18. Foddai A, Idini G, Fusco M, Rosa N, De la Fe C, Zinellu S, et al. Rapid differential diagnosis of Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma bovis based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP. Molecular and cellular probes. 2005; 19(3):207-12.
19. khosravi A, hashemi A. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis clinical strains using restrikction fragment length polymorphism technique based on hsp65 gene. J Shahrekord Univ Med Sci. 2005; 7 (3):1-8.[persian]
20. Saito R, Oshitani H, Masuda H, Suzuki H. Detection of amantadine-resistant influenza A virus strains in nursing homes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis with nasopharyngeal swabs. Journal of clinical microbiology. 2002; 40(1):84-8.