نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۲۲، بهـار ۱۳۹۶
ص‌ص: ۳۵~۴۲

بررسی اثر لاکتوفرین شیر شتر بر تکثیر ویروس آنفلوآنزا سویه H9N2

- **حمید رضا فرزین** (نویسنده مسئول)
عضو هئیت علمی بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی- شعبه شمال شرق کشور، مشهد
- **سعید زیبائی**
دانشیار بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی- شعبه شمال شرق کشور، مشهد

شماره تماس نویسنده مسئول: ۹۱۵۳۰۹۴۲۱۳۰

چکیده:

آنفلوانزا مرغی ساب‌تایپ H_9N_2 در میان پرندگان وحشی پراکنده می‌باشد. هم‌چنین در مرغ خانگی شایع است و با موفقیت از مرز بین گونه‌ای عبور کرده و انسان را آلوده نموده است. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که این ساب‌تایپ در تولید ویروس بیماری‌زای H_5N_6 شرکت دارد که هشداری جهت ظهور سویه‌های نوظهور مقاوم به داروهای ضدویروسی است. در نتیجه به‌شدت به داروهای ضدویروسی جدید نیاز خواهد بود. در این تحقیق، اثر لاکتوفرین شیر شتر بر روی عفونت ویروس آنفلوانزا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که لاکتوفرین شیر شتر قادر به جلوگیری از اثرات سایتوپاتیک ویروس آنفلوانزا بوده و موجب مهار هماگلوتیناسیون ویروس آنفلوانزا بعد از انکوبه شدن لاکتوفرین با ویروس در مرحله قبل از جذب سلول می‌باشد. این نتایج بینش بیشتری در مورد فعالیت ضدویروسی لاکتوفرین شیر شتر نشان می‌دهد و به‌عنوان روشی جدید برای درمان عفونت ویروس آنفلوانزا پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: هماگلوتیناسیون، سلول‌های MDCK ، همانندسازی A549، سایتوپاتیک ویروس، ضدویروس

Applied Animal Science Research Journal No 20 pp: 35-42

Survey of Effects of Camel Milk Lactoferrin on H9N2 Influenza Virus Replication

By: Farzin, H. R. and S. Zibaii
Scientific Boards of Razi Institute. North East Brunch of Iran

The avian influenza H_9N_2 subtype which has circulated in wild birds, is prevalent in domestic poultry, and has successfully crossed the species boundary to infect humans, phylogenetic analyses showed that viruses of this subtype appear to have contributed to the generation of highly pathogenic H_5N_6 viruses the alarming emergence of influenza virus strains that are resistant to available antiviral medications highlights the need for new antiviral drugs. Camel milk lactoferrin (CLF) is a multifunctional glycoprotein that plays an important role in innate immunity against infections, including influenza. In this research, we have analyzed the effect of camel milk lactoferrin on influenza A virus infection invitro. Results showed that CLF was able to prevent influenza virus cytopathic effects and inhibition of influenza virus hemagglutination when incubated with the virus before the adsorption. These results provide further insights on the antiviral activity (CLF) and suggest novel strategies for treatment of influenza virus infection.

Key words: A549 replication, Antivirus, Cytopathic virus, Haemagglutination , MDCK celles

مقدمه

آنفلوآنزا یکی از علل اصلی عمده مرگ و میر در سرتاسر جهان می‌باشد. ویروس آنفلوآنزای A توانایی ایجاد اپیدمی و یا پاندمی‌های بالقوه از طریق موتاسیون در شاخص‌های آنتی‌ژن موجود در گلیکوپروتئین سطحی[1] و یا نوترکیبی و تعویض قطعات ژنی[2] بین سویه‌های ویروس‌های مختلف آنفلوآنزای A را دارا هستند (Chang-Won and Yehia, 2009; X iaokang, *et al.*, 2012).

این موتاسیون‌ها به ویروس‌های آنفلوآنزا اجازه می‌دهند که از پاسخ‌های ایمنی میزبان فرار کنند و از این رو ما را ناچار به تولید سالانه واکسن از ویروس‌های جدید می‌کنند، که مستلزم صرف هزینه‌های گزاف می‌باشد. واکسن‌های زنده ضعیف شده و واکسن‌های غیرفعال سطح قابل قبولی از ایمنی را ایجاد می‌کنند. با این وجود، این نوع واکسن‌ها به‌عنوان وسیله‌ای مناسب به‌منظور مقابله با ویروس‌های نوظهور آنفلوآنزا محسوب نمی‌شوند. بسیاری از این واکسن‌ها براساس پروتئین‌های سطحی HA و NA ویروس تهیه می‌شوند که به‌دلیل ناپایداری ژنتیک پروتئین‌های سطحی سویه‌های بیماری‌زای جدید هرساله در اثر چرخش در جمعیت به‌وجود می‌آیند (Capua and Alexander, 2009; Zambon and Meduiro, 2001).

لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین چندمنظوره با اتصال به آهن می‌باشد که نقش مهمی در تنظیم سیستم ایمنی بدن و مقابله در برابر باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها دارد.

لاکتوفرین توسط موکوس سلول‌های اپیتلیال در گونه‌های مختلف پستانداران از جمله انسان، گاو، بزغاله، اسب، سگ و چندین نوع

[1] Antigenic drift
[2] Antigenic shift

جونده تولید می‌شود. این گلیکوپروتئین در موکوس‌های ترشحی از جمله در بزاق، اشک، مایع واژینال، منی، ترشحات برونشیال، صفرا، مایع دستگاه گوارش، ادرار و به مقدار زیاد در شیر یافت می‌شود (Susana, *et al.*, 2009).

لاکتوفرین شیر شتر جزء اولین پروتئین‌های خانواده بزرگ ترنسفرین‌ها می‌باشد که دارای ویژگی اتصال به آهن و آزادسازی آن به طور هم‌زمان را دارد. علاوه بر اتصال به آهن از خود طیف گسترده‌ای از اتصالات مثل توانایی اتصال به انواع مختلف سلول و گونه‌هایی با بار منفی مثل DNA و هپارین و دیگر گلیکوزآمینوگلیکان و لیپوپلی‌ساکاریدها را نشان می‌دهد. هم‌چنین دارای بسیاری از روابط متقابل و متنوع می‌باشد از جمله به‌عنوان یک ترکیب ضدباکتری، ضدقارچی، ضدویروس، آنتی‌اکسید، تعلیق‌کننده سیستم ایمنی و پاسخ التهاب و یک عامل رشد وجذب آهن می‌باشد (Stefan, *et al.*, 1999).

لاکتوفرین یک ضدویروس قوی ماست که می‌تواند همانندسازی را در بسیاری از ویروس‌ها مهار کند. فعالیت ضدویروسی لاکتوفرین انسانی برای اولین بار در موش‌های پلی‌سیتمی[3] آلوده به ویروس friend virus complex دیده شد.

از سال ۱۹۹۴ فعالیت ضدویروسی لاکتوفرین انسانی و گاوی برعلیه ویروس‌های دارای پوشش و فاقد پوشش نشان داده شده است(Susana, *et al.*, 2009) .

اتصال لاکتوفرین به هپارین سولفات پروتئوگلایسین از این ارتباط اولیه جلوگیری می‌کند در نتیجه مانع ورود ویروس به سلول میزبان می‌شود که برای ویروس‌های روتاویروس[4]، پولیوویروس[5]، آدنوویروس[6]، انتروویروس[7]، سایتومگالوویروس[8]، ویروس تبخال گربه[9]، هانتاویروس[10]، HIV-1، ویروس پاپیلوم انسانی[11]، ویروس سین سیتیال *تنفسی*[12] قابل توصیف است. هم‌چنین لاکتوفرین به‌عنوان یک عامل تداخل در بسته‌بندی کپسید[13] شناخته شده است در نتیجه از تکثیر ویروس ممانعت می‌کند.

مطالعات نشان می‌دهند که لاکتوفرین‌ها تنها به طور مستقیم از طریق اتصال به سلول هدف یا ذرات ویروسی اثر خود را نمی‌گذارند. بلکه به‌طور غیرمستقیم از طریق تنظیم سیستم ایمنی ایجاد پاسخ می‌کنند. اضافه کردن لاکتوفرین به کشت سلول یا حیوانات یا داوطلبان سالم منجر به افزایش سلول‌های طبیعی کشنده[14]، مونوسایت‌ها و ماکروفاژها و گرانولوسایت‌ها می‌شود. این نوع سلول‌ها نقش مهمی را در طی مراحل اولیه عفونت ویروس قبل از پاسخ ضد ویروس سیستم ایمنی اختصاصی دارند (Khan, *et al.*, 2001; Susana *et al.*, 2009).

---

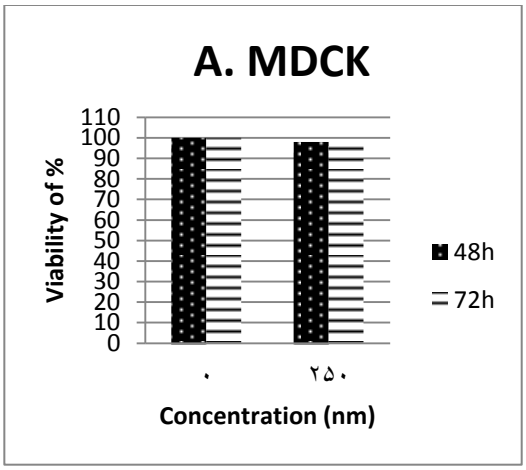
[3] Polycythemia
[4] Rotavirus
[5] Poliovirus عامل فاج اطفال
[6] Adenovirus
[7] Enterovirus
[8] Cytomegalovirus (CMV)
[9] Hsv-1 عفونت ویروس تبخال یا ویروس
[10] Hantavirus
[11] Human papilloma virus (HPV)
[12] Respiratory syncytial virus
[13] محصور *شده* درون یک پوشش پروتئینی (کپسید)
[14] Natural killer cell (NK cells)

مواد، روش‌ها و نتایج:

۱) بررسی اثر سایتوتوکسیک لاکتوفرین[15]

سلول‌های A549 و MDCK با دوزهای ثابتی از لاکتوفرین برای مدت زمان ۴۸ و۷۲ساعت تیمار گردید در نهایت میزان تغییرپذیری مورفولوژی سلول با مشاهده میکروسکوپی و میزان حیات با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت.

همان‌طور که در نمودار (۱) مشاهده می‌گردد لاکتوفرین هیچ‌گونه اثر سایتوتوکسیک قابل‌ملاحظه‌ای بر سلول‌ها نگذاشته است.



نمودار ۱- تاثیر لاکتوفرین بر روی توانایی زنده بودن سلول‌های MDCKو A549 . سلول‌ها با دوز ثابتی از لاکتوفرین 250nM برای مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار داده شدند و سپس به وسیله طیف‌سنجی جذبی با روش MTT درصد سلول‌های زنده اندازه‌گیری شدند (هر آزمایش سه مرتبه تکرار شد).

۲) تعیین مرحله تاثیرگذاری لاکتوفرین

برای آن‌که مشخص شود لاکتوفرین در کدام یک از مراحل عفونت تاثیر ضد ویروسی خود را خواهد گذاشت در چهار مرحله به شرح زیر عمل شد:

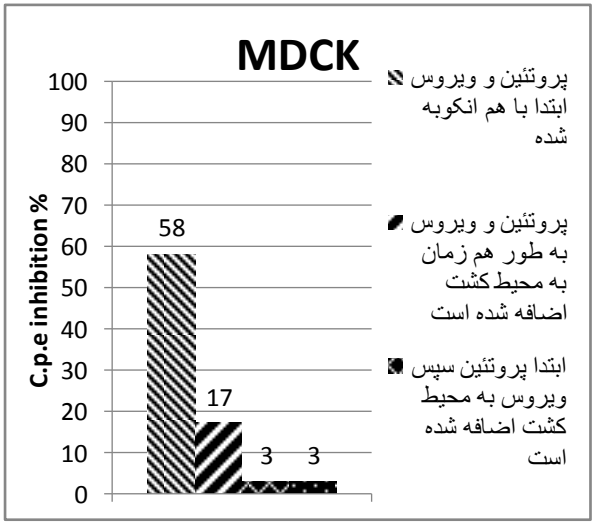
۱- لاکتوفرین و ویروس به\طور هم‌زمان بر روی سلول اثر داده شد.

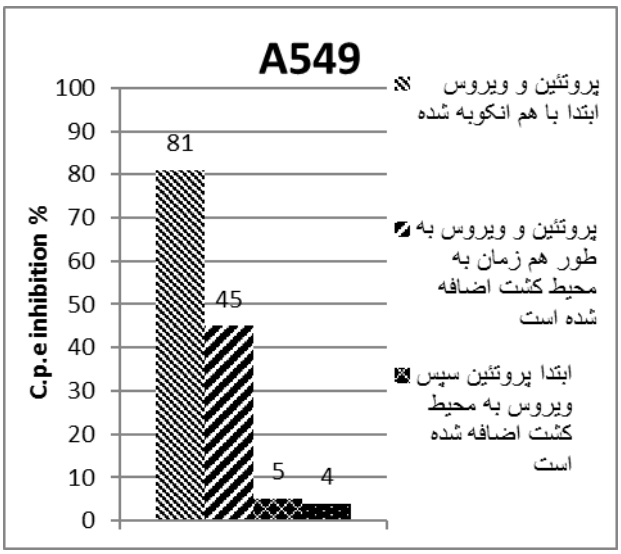
۲- ابتدا لاکتوفرین سپس ویروس بر روی سلول اثر داده شد.

۳- ابتدا ویروس سپس لاکتوفرین بر سلول اثر داده شد.

۴- ویروس و لاکتوفرین را با هم انکوبه کرده سپس یر سلول اثر داده شد.

همان طور که در شکل نشان داده شده است زمانی که ویروس و لاکتوفرین با هم انکوبه شده سپس بر روی سلول اثر داده شدند دارای بیشترین اثر مهاری بودند. هم‌چنین، زمانی که لاکتوفرین و ویروس به‌طور هم‌زمان بر روی ویروس اثر داده می‌شوند، به‌طور قابل ملاحظه‌ای اثرات سایتوپاتیک ویروس[16] را مهار می‌کند. در حالی که افزودن لاکتوفرین به محیط کشت سلول در مرحله قبل و بعد از عفونت با ویروس هیچ‌گونه اثر مهاری قابل توجهی نداشت. همان‌طور که در نمودار(۲) نشان داده شده است لاکتوفرین اثرات سایتوپاتیک ویروس را بر روی سلول‌های A549 به مراتب بهتر از سلول‌های MDCK مهار می‌کند.





نمودار۲- برسی اثر سایتوپاتیک ویروس آنفلوآنزا (M.O.I 1) در حضور لاکتوفرین شیر شتر با غلظت نهایی 250nM بر روی سلول‌های سرطانی کلیه سگ (MDCK) وسلول‌های سرطانی ریه انسان A549 بعد از ۷۲ساعت عفونت با روش طیف سنجی جذبی قرمز خنثی (هر آزمایش سه بار تکرار شد).

[15] Cytotoxin lactoferrin

[16] Cytopathic virus

۳) تعیین تیتر ویروس:

آخرین رقت: 10^{-9} ½فاصله لگاریتمی : 0.5

تعداد موارد منفی : ۱۰ تعداد در هر گروه : ۵

$$\text{تیتر ویروس} = \text{آخرین رقت} + \frac{1}{2}\ \text{فاصله لگاریتمی} \times \frac{\text{تعداد موارد منفی}}{\text{تعداد در هر گروه}}$$

در نهایت طبق فرمول تیتر ویروس برابر است با $10^{9.5}$ واحد دریک میلی لیتر.

٤) تست هماگلوتیناسیون[17] (HA) و مهار هماگلوتیناسیون (HI) :

تست HA نشان می‌دهد که ویروس در نمونه که معمولاً مایع آلانتوئیک[18] است، وجود دارد. در حالی که آزمون HI برای شناسایی آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده در سرم می‌باشد. برای این آزمون سرم را با آنتی‌ژن ویروس آنفلوآنزا A انکوبه می‌کنند. اگر آنتی‌بادی خنثی‌کننده در سرم وجود داشته باشد به گلیکوپروتئین HA و NA سطحی متصل شده و مانع واکنش هماگلوتیناسیون می‌شود. همان‌طور که در جداول ۱ و ۲ دیده می‌شود، لاکتوفرین به اندازه دو واحد نسبت به گروه کنترل مانع واکنش هماگلوتیناسیون شده است.

۵) مقدار دوز از عامل عفونت که در ۵۰ درصد سلول‌ها تغییرات پاتولوژیک ایجاد می‌کند (TCID50)

این روش برای تعیین کمیت و نیز عفونت هر ویروس که دارای اثرات سایتوپاتیک در کشت بافت سلولی است انجام می‌شود که در طی یک دوره معقول ۵ تا ۲۰ روزه ویروس در کشت سلولی تکثیر می‌یابد در حالی که سلول‌ها زنده می‌باشند. TCID50 به وسیله رقت سریال از نمونه ویروس در کشت سلولی تعیین می‌شود. بدین منظور TCID50 سریال رقت از ویروس (m.o.i 5-1-0.5-0.1) بعد از انکوبه با غلظت ثابتی از لاکتوفرین 250 nM بر روی سلول‌های MDCK و A549 بعد از شش روز نسبت به گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفته است. همان‌طور که در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است، سلول‌های A549 نسبت به گروه کنترل دو واحد و سلول‌های MDCK نسبت به گروه کنترل یک واحد هماگلاتیناسیون را مهار می‌کند.

[17] Haemagglutination
[18] Atlantic liquid

جدول ۱- واکنش مهار هماگلوتیناسیون در سریال رقتی از ویروس و لاکتوفرین با غلظت ثابت 250 nM

شماره چاهک	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹
لاکتوفرین	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul
رقت ویروس	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
RBC	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul
نتایج	+	+	+	+	+	+	-	-	-

جدول ۲- واکنش هماگلوتیناسیون در سریال رقتی از ویروس و مقدار ثابت PBS

شماره چاهک	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹
PBS	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul
رقت ویروس	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
RBC	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul	۲٥ ul
نتایج	+	+	+	+	+	+	+	+	-

جدول۳- مطالعه TCID50 بر سلول A549

Moi	٥	۱	۰/۵	۰/۵
گروه کنترل	+	+	+	+
ویروس بعد از انکوبه با لاکتوفرین	+	+	_	_

جدول ٤- مطالعه TCID50 بر سلول MDCK

Moi	٥	۴	۰/۵	۰/۵
گروه کنترل	+	+	+	+
ویروس بعد از انکوبه با لاکتوفرین	+	+	+	_

بحث

به‌دلیل توانایی بسیار بالای ویروس در تغییرات آنتی‌ژنتیک که گاهی اوقات منجر به ظهور یک ویروس کاملاً جدید می‌شود، تلاش برای جلوگیری از آنفلوآنزا به وسیله واکسیناسیون بسیار پیچیده می‌باشد. در دسترس بودن طیف گسترده از داروهای ضدویروس برای مبارزه با آنفلوآنزا بسیار مهم می‌باشد. به خصوص دانستن ترکیبی از داروهای ضدآنفلوآنزا با هدف‌های مختلف ویروس یا دارای مکانیسم‌های عمل مختلف بسیار اهمیت دارد که باعث درمان فعال‌تر آنفلوآنزا و به حداقل رساندن ظهور سویه‌های مقاوم ویروس می‌شود (Capua and ; Abolnik and January, 2007 Alexander, 2009).

ویروس A(chicken/Iran/772/1999 (H_9N_2) قادر است در سلول‌های A549 (سلول‌های سرطانی ریه انسان) تکثیر یابد و ایجاد اثرات سایتوپاتیک نماید که نشان‌دهنده بروز تغییرات در این ویروس در راستای آلوده نمودن انسان است. بنابراین، بررسی بیشتر و مطالعات مراقبتی مستمر در راستای مبارزه با این ویروس ضروری است (Butt, *et al.*, 2005; Guan, *et al.*, 1999; Moosakhani, 2006).

مشخص شده کودکانی که با شیر تغذیه می‌شوند بر علیه بیماری‌های عفونی، تنفسی و مجاری روده‌ای مقاوم می‌باشند. شیر علاوه بر ترشح IgA، Igm دارای ترکیبات متعددی به‌غیر از آنتی‌بادی از جمله لاکتوفرین می‌باشد که دارای فعالیت ضدمیکروبی می‌باشد.

فعالیت ضدویروس لاکتوفرین انسانی برای اولین بار در موش‌های پلی‌سیستمی آلوده به ویروس Friednd virus coplex دیده شد. از سال ۱۹۹۴ فعالیت ضدویروس لاکتوفرین انسانی و گاوی بر علیه ویروس‌های دارای پوشش و فاقد پوشش نشان داده شده است. میزان تاثیر لاکتوفرین بسته به میزان اشباع بودن و سیکل اضافه شدن پروتئین متفاوت می‌باشد (Susana, *et al.*, 2009).

در این مطالعه برای پی بردن به سیکل زمان تاثیرگذاری لاکتوفرین شیر شتر به ویروس H_9N_2، در چهار مرحله مطابق با قسمت نتایج پروتئین و ویروس به محیط کشت اضافه گردیدند.

در این مطالعه نشان داده شد که لاکتوفرین شیر شتر وقتی بیشترین تاثیر ضد ویروس را دارد که ابتدا همراه با ویروس انکوبه شود و در نهایت به محیط کشت اضافه شود. هم‌چنین مشخص شد که لاکتوفرین شیر شتر قادر است هماگلوتیناسیون ویروس را مهار کند.

با توجه به داده‌های فوق نتیجه‌گیری می‌شود که لاکتوفرین شیر شتر با اتصال به هماگلوتینین (HA) ویروس آنفلوآنزا مانع اتصال ویروس به گیرنده خود در سطح سلول میزبان می‌شود.

نتایج به‌دست آمده با هرپس‌ویروس، آدنوویروس و پاپیلوویروس که در آن‌ها پروتئین با ویروس برای اتصال به گیرنده سلولی رقابت می کرد، متفاوت می‌باشد (Susana, *et al.*, 2009).

در این تحقیق نشان داده شدکه لاکتوفرین شتر با تعامل با ناحیه HA مانع هماگلوتیناسیون و تکثیر ویروس در کشت سلولی می‌شود که خود تشکیل یک کلاس جدید از لیپتیدهای ضدویروس آنفلوآنزا را می‌دهد، به‌طوری‌که نمونه‌های تجاری موجود نیز بر روی پروتئین نورآمینیداز و ماتریکس M_2 ویروس تاثیرگذار می‌باشند.

باید توجه داشت که مهار ویروس وابسته به دوز پروتئین می‌باشد. این مطالعه نشان داد که ویروس بر روی سلول‌های MDCK نسبت به سلول A549 اثرات سایتوپاتیک بیشتری دارد که خود نشان‌دهنده میزان توانایی ویروس برای اتصال به گیرنده سلولی می‌باشد. هم‌چنین، لاکتوفرین شیر شتر اثر بازدارندگی بیشتری بر روی سلول‌های A549 نسبت به MDCK دارد که می‌توان نتیجه گرفت که چون ویروس توانائی ایجاد فاکتورهای لازم جهت آلوده‌سازی سلول‌های ریه انسان را به طور کامل ندارد، لاکتوفرین قادر است نسبت به سلول‌های MDCK اثر بازدارندگی بهتری داشته باشد.

لاکتوفرین اشباع از یون‌های فلزی مختلف هیچ تاثیری بر فعالیت ضدویروس آن برعلیه هرپس ویروس ندارد در حالی‌که لاکتوفرین اشباع از روی و منگنز در مقایسه با فرم آزاد یا اشباع از آهن، تاثیر مهاری کمتری برای روتاویروس دارد. هم‌چنین لاکتوفرین اشباع از روی Zn^{2+} در مقایسه با لاکتوفرین اشباع یا آزاد از آهن تاثیر مهاری بیشتری بر علیه پولیوویروس (ویروس فلج اطفال) دارد.

مشاهده تفاوت در میزان فعالیت ضدویروس لاکتوفرین بسته به نوع یون اشباع شده را می‌توان این چنین توضیح داد که یون‌های فلزی باعث تغییر کنفورماسیون پروتئین می‌شوند. به طور خاصی ساختار سوم لاکتوفرین آزاد و اشباع با هم متفاوت می‌باشد.

در لاکتوفرین آزاد N-lobe دارای کنفورماسیون باز و C-lobe دارای کنفورماسیون بسته است در صورتی که هر دو لوب لاکتوفرین اشباع دارای کنفورماسیون بسته می‌باشد.

هم‌چنین، شدت کاتیونی لاکتوفرین می‌تواند در میزان توانایی آن در اتصال به مولکول‌ها با بار منفی تاثیرگذار باشد. سیالیک اسید گلیکوپروتئین بخشی از بار منفی پروتئین می‌باشد چرا که گروه کربوکسیل آن در PH فیزیولوژیک تمایل به جدا شدن دارد. بنابراین می‌توان با حذف بار منفی از لاکتوفرین میزان اتصال آن به گروه‌های با بار مثبت سطح غشاء را افزایش داد و مانع اتصال ویروس به گیرنده گردید (Susana, *et al.*, 2009; Stefan, *et al.*, 1999).

منابع

Abolnik, C. and January, P. (2007) Molecular epidemiology of newcastle disease and avian influenza in South Africa. PhD Thesis. University of Pretoria. South Africa.

Butt, K. M., G.J. Smith, H. L. J. Chen Zhang, Y. H. Leung, K. M. Xu and *et al*. (2005). Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. Journal of Clinical Microbiology. 43: 5760-5767.

Capua, I. and Alexander, D. J. (2009) Avian influenza and newcastle disease. Italia: Springer.

Chang-Won, L. And Yehia, M. (2009) Avian influenza virus. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 32:301–310.

Guan Y., K. F. Shortridge, S. Krauss and Webster R.G. (1999). Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the ‘‘internal’’ genes of H5N1 viruses in Hong Kong Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96:9363–9367.

Khan, J., P. Kumar, P. Raghvendra, M. Sahani, S. Sharma and Srinivasan, A. (2001) Camel lactoferrin, a transferrin-cum-lactoferrin: crystal structure of camel apolactoferrin at 2.6 A resolution and structural basis of its dual role. Journal of Molecular Biology. 309(3):751-761.

Moosakhani, F. (2006) Characterization of hemagglutinin gene of influenza A H9N2 viruses isolated from industrial poultry of Iran during 2004-2005. Thesis of research and science section. Islam Azad Univesity.

Stefan, R., M. Ackermann, Z. Farah, and Puhan, Z. (1999) Sequence analysis of camel lactoferrin. International Dairy Journal. 9:481-486.

Susana, A . C. González, D. Sigifre, G. Arévalo and Quintín, R. (2009) Lactoferrin: structure, function and applications. International Journal of Antimicrobial Agents. 33: 301.

X iaokang Li, Wenb ao Qi, Jun He, Zhangy ong Ning, Yue Hu, Jin Tian, Peiron g Jiao, Chenggang Xu, Jianxin Chen, Juergen Richt, Wenjun Ma and Ming Liao. (2012) Molecular basis of efficient replication and pathogenicity of H9N2 Avian influenza viruses in mice. Plosone. 7(6): 401.

Zambon, MC. and Meduiro. R. (2001) Pathogenesis of Influenza A and B in humans. Reviews in Medical Virology.11:227-241.