

بررسی خصوصیات ملکولی و پاتوژنسیته یک سویه جدید از زیرگروه J ویروس لکوز همراه با وقوع استئوسارکوم پلی استئوتیک در هوبره

پیمان محمدزاده^{۱*}، سجاد محمدی^۲، عرفان افتخار^۲، کیمیا عظیمی^۲

چکیده

استخوانی است که از سلول‌های مزانشیمی پرتوان (pluripotent) منشأ می‌گیرد و معمولاً اسکلت آپاندیکولا (Appendicular Skeleton) و محوری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در موارد کمتر، زمانی که این تومور به‌عنوان یک فرم خارج اسکلتی طبقه‌بندی می‌شود، ممکن است منشأ اولیه آن از بافت‌های نرم باشد (۱).

در میان حیوانات اهلی، استئوسارکوم عمدتاً سگ‌ها و گربه‌ها را با پیش‌آگهی ضعیف و میزان متاستاز بالا در سنین بین ۸ تا ۱۰ سال مبتلا می‌کند (۲). در پرندگان، استئوسارکوم غیرمعمول است و تنها چند مورد از گونه‌های اهلی و وحشی گزارش شده است (۳) که در آن‌ها تومور در قسمت محوری یا معمولاً در اسکلت آپاندیکولار ایجاد شده است (۴). برخی از عوامل عفونی نقش مهمی در انکوژنسیته دارند. در حیوانات اهلی، رتروویروس‌ها معمولاً با تظاهرات توموری در گونه‌های مختلف، از جمله گاو، گوسفند، گربه و مرغ مرتبط هستند (۵). در پرندگان، مهم‌ترین رتروویروس‌های مرتبط با نئوپلاسم‌ها، ویروس لکوز پرندگان (ALV، آلفا رتروویروس) و ویروس رتیکولاندوتلیویزیس (REV، گامارتروویروس) هستند (۶).

تومورهای میلوپستییک یا لنفوپرولیفراتیو و لوسمی و همچنین پوکی استخوان (osteopetrosis)، ممکن است در جوجه‌های آلوده به ALV رخ دهد (۷). گروه بیماری‌های لکوز/سارکوم، انواع نئوپلاسم‌های خوش‌خیم و بدخیم قابل

استئوسارکوما، به‌عنوان نوعی تومور نادر اولیه استخوانی در پرندگان توصیف شده است که اسکلت محوری را تحت تأثیر قرار می‌دهد، گاهی نیز در بافت نرم اتفاق می‌افتد که اصطلاحاً استئوسارکوم خارج اسکلتی نامیده می‌شود. رتروویروس‌ها معمولاً با ایجاد تومورهای توپر در گونه‌های مختلف پرندگان مرتبط هستند. هدف از این گزارش توصیف یک مورد استئوسارکوم همراه با وقوع لکوز لنفوئید ناشی از یک موتانت جدید از زیرگروه J ویروس لکوز پرندگان در یک هوبره (Chlamydotis McQueen) است. یک هوبره با سابقه لنگش مزمن و تورم ناگهانی ناحیه شکمی به مدت دو روز در طی شب تلف شد. هیستوپاتولوژی یک نئوپلاسم مزانشیمی ارتشاحی متشکل از سلول‌های دوکی با پلئومورفیسم سلولی متوسط را نشان داد که در دسته‌هایی سازمان‌دهی شده و با رسوب مشخص ماتریکس استئوئیدی پراکنده شده بود و با استئوسارکوم مبتلا به استخوان ران و تیبتوتارسوس با متاستاز کبدی و کلیوی همراه بود. ایمونوهیستوشیمی تومور اولیه و متاستاتیک بیان ویمتین توسط سلول‌های نئوپلاستیک را نشان داد. نمونه‌هایی از نئوپلاسم؛ کلیه، کبد و طحال برای PCR پردازش شدند که امکان نمایش DNA موتانتی جدید از زیرگروه J ویروس لکوز پرندگان پروویروسی (ALV-J) را فراهم کرد و تلقیح آن به جوجه‌های SPF نشان داد که لود ویروسی سویه جدا شده در ارگان‌های سیستم ایمنی به‌طور قابل توجهی بالاتر از HPRS103 بوده و کاهش وزن، ویرمی و شدینگ ویروس و میزان پارگی فیبرهای میکارد و نفوذ لنفوسیتی به رگ‌های لنفوی روی بیشتر بود. نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه وقوع استئوسارکوم همراه با بررسی خصوصیات یک موتانت جدید از ALV-J را گزارش کرده است.

واژگان کلیدی: استئوسارکوما، زیرگروه J ویروس لکوز پرندگان،

حیات وحش، رتروویروس، هوبره آسیایی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۱۴

مقدمه

استئوسارکوم (Osteosarcoma) یک تومور بدخیم

۱. گروه علوم درمانگاهی، واحد سنج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

peymanpathologist@iausdj.ac.ir

۲. دانشجوی مقطع دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج، ایران.

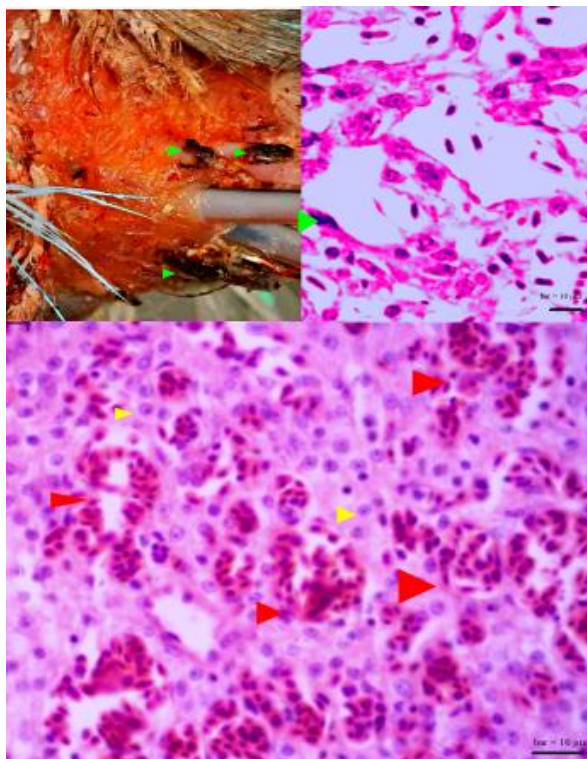
منطقه غیر کدکننده عمدتاً شامل مناطق ترجمه نشده (UTR) و تکرارهای طولانی ترمینال (LTR) است. جهش در ناحیه ۳' UTR می‌تواند بر سطح تکثیر ویروس و پاتوژنز تأثیر بگذارد (۱۹). ۳' LTR حاوی پروموتور و عنصر تقویت کننده قوی است که در تکثیر و رونویسی ویروس نقش دارند (۲۰). ALV-J یک رتروویروس با نرخ جهش بالا است. علاوه بر این، سویه‌های جهش یافته ALV-J بیماری‌زایی را افزایش داده‌اند (۲۱). جهش‌های مبتنی بر تیروزین در گلیکوپروتئین شماره ۳۷ از سری جهش‌های شماره ۱۷ ویروس ALV-J شناسایی شده در چین می‌تواند موتیف‌های YxxM، ITIM و ITAM را ایجاد کند که پاتوژنز ویروسی و تومورزایی را ترویج می‌کند (۲۲). هوبره آسیایی پرنده بزرگی از راسته میس‌مرغ‌سانان است. زیستگاه این پرنده از شبه‌جزیره سینا گرفته تا قزاقستان و مغولستان ادامه دارد. هوبره آسیایی (Chlamydotis macqueenii) قبلاً به‌عنوان زیرگونه‌ای از هوبره آفریقایی (Chlamydotis undulata) در نظر گرفته می‌شده است؛ اما اکنون دو گونه مستقل محسوب می‌شوند. هوبره آسیایی در زیستگاه‌های بیابانی و مناطق خشک شنی زادوولد می‌کند. یک مطالعه در عربستان سعودی نشان داده که این‌گونه بسیار وابسته به پوشش گیاهی خوب به ویژه تعداد زیاد بوته‌های گیاه کبر است (۲۳). یک مطالعه در نقاط استپی ایران هم نشان داده که محل آشیانه‌سازی در جایی انتخاب می‌شود که تراکم جمعیتی حشرات زیاد باشد (۲۴). این پرنده زمانی در مناطق کویری و استپی جنوب آسیا بسیار فراوان بود اما شکار بی‌رویه با استفاده از بازهای شکاری، به ویژه بالابان و شاهین معمولی، تفنگ و تله‌گذاری این پرنده را تا آستانه انقراض کامل پیش برد؛ تا اینکه در دهه ۱۹۷۰ تلاش‌های حفاظتی و ممنوعیت شکار در برخی نقاط توانست آن را از انقراض نجات دهد. این پرنده اکنون جزء پرنده‌گان آسیب‌پذیر (VU) است، همچنین در ضمیمه I

انتقال را شامل می‌شوند که توسط ویروس‌های خانواده رتروویریده ایجاد می‌شوند. این رتروویروس‌های پرنده‌گان، از جمله ویروس‌های مرتبط با ALV، قبلاً در زیرجنسی به نام انکورناویروس‌های پرنده‌گان نوع C قرار می‌گرفتند، اما اکنون آلفارتروویروس نامیده می‌شوند (۸). ALV پاتوژنی است که باعث بیماری نئوپلاستیک و سرکوب سیستم ایمنی می‌شود (۹). زیرگروه J ویروس لوکوز پرنده‌گان (ALV-J) یک آلفارتروویروس معمولی است که باعث میلویتوماتوز و سایر بیماری‌های توموری از جمله همانژیوماتوز، لکوز لنفوسیتی و اریتروبلاستوز در پرنده‌گان می‌شود (۱۰). ALV-J می‌تواند باعث سرکوب شدید سیستم ایمنی، توقف رشد و کاهش تولید تخم شود، بنابراین صنعت طیور را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۱). ALV-J اولین بار در سال ۱۹۸۸ در انگلستان جدا شد (۱۲) و تا به امروز، در سراسر جهان یافت می‌شود (۱۳). ALV-J یک دایمر RNA تک رشته‌ای مثبت است که ژن gag، pol و env را از انتهای ۵ تا ۳ اینچ کد می‌کند (طول ALV-J؛ ۷٫۶ کیلوبایت) (۱۴). ژن gag حفظ می‌شود و پروتئین ساختاری هسته پروتئین گلیکوزیله ویریون را کد می‌کند (۱۵). ژن pol عمدتاً ترانس کریپتاز معکوس (RT) و اینتگراز (IN) را رمزگذاری می‌کند که برای تکثیر ویروسی حیاتی هستند (۱۶). ژن pol جهش یافته ALV-J مزیت همانندسازی رقابتی قوی تری در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی دارد (۱۷). ژن env عمدتاً پروتئین‌های پوششی شامل پروتئین سطحی (SU) و پروتئین گذرنده (TM) را کد می‌کند. پروتئین SU عمدتاً توسط ژن gp85 کدگذاری می‌شود. SU دارای یک دامنه عملکردی است که به میزبان‌ها متصل می‌شود که به راحتی می‌تواند جهش پیدا کند و میزبان را وادار به تولید آنتی‌بادی‌های میانی کند. جهش اسید آمینه در SU ممکن است انتقال عمودی را تسهیل کند و بیماری‌زایی ویروس را افزایش دهد (۱۸).

اقدامات حمایتی اولیه انجام شد اما قبل از انجام مداخلات جدی درمانی، پرنده تلف شد؛ و لذا کالبد شکافی بلافاصله انجام شد (نگاره ۲).



نگاره ۲: نمای ماکروسکوپییک از کالبد گشایی هوبره



نگاره ۳: وجود کانونهایی از تاولهای خونی Blood Blisters بر روی پوست (پیکان سبز) و نمای میکروسکوپییک بخش زیرجلدی پوست ناحیه مبتلا، کانالهای عروقی بصورت نامنظم همراه با وجود اشکال میتوزی (پیکان سبز) (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین، بزرگنمایی ۱۰۰ برابر، $bar = 10 \mu m$). سلولهای بخش عمقی درم به حالت کروی تا دوکی دیده می شوند (پیکان زرد) و بر روی داربست کلاژنی

کنوانسیون منع تجارت بین المللی گونه های در معرض انقراض (CITES) قرار دارد (۲۵). طبیعتاً بررسی موارد پاتولوژیک، بیماری ها و مشکلات این پرنده از اهمیت بالایی برخوردار است. هدف از این گزارش توصیف یک مورد استئوسارکوم همراه با وقوع لکوز لنفوئید در هوبره است. این اولین گزارش از استئوسارکوم در هوبره با تظاهرات پلی استئوتیک غیر معمول و همراه با عفونت ALV-J است.

روش کار

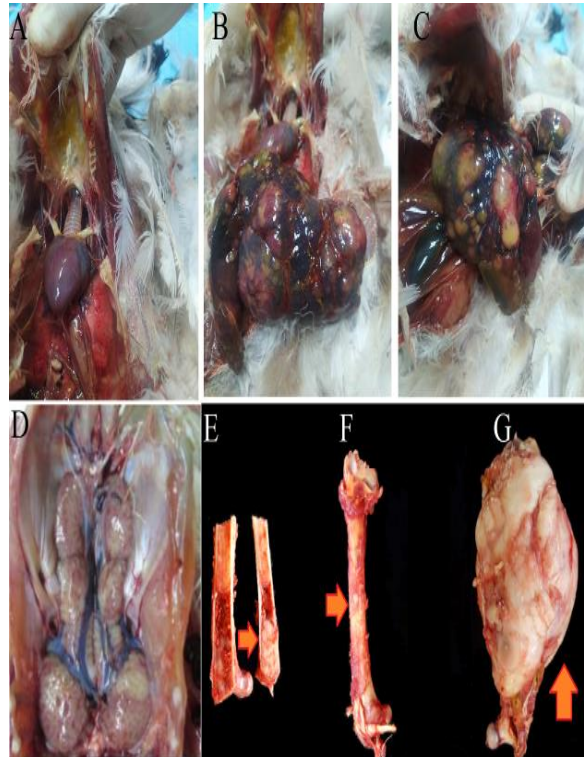
یک هوبره نر بالغ اسیر که در باغ وحش ارم تهران نگهداری می شد، به مدت دو روز علایم لنگش و هیپورکسیا (کاهش اشتها) را نشان می داد. لذا جهت مداوا به کلینیک باغ وحش ارجاع شد. معاینه فیزیکی وجود یک توده سفت غیر زخمی و ثابت را در استخوان ران سمت چپ با قطر تقریباً ۷ سانتی متر نشان داد. در معاینه رادیوگرافی یک پرولیفریشن رادیوپاک همراه با لبه های نامنظم و لیز استخوانی در دیافیز استخوان ران سمت چپ را نشان داد که تا مفصل تیبیوتارسال امتداد یافته بود. چندین کانون رادیوپاک نیز در کانال مدولاری تیبیوتارسوس چپ، استخوان ران راست و تیبیوتارسوس راست مشاهده شد (نگاره ۱).



نگاره ۱: یافته های رادیولوژیک در هوبره نر بالغ مبتلا به پلی استئوتیک اوستئوسارکوما. افزایش حجم استخوان ران چپ مرتبط با نواحی کانونی رادیو اویسسته گسترده. در داخل کانال مدولاری هر دو پا نواحی کانونی با افزایش مشخص رادیو اویسسته دیده می شود. (فلش نارنجی).

به همراه ساییدگی پوستی بر روی جناغ و عضله سینه همراه با خونریزی در فولیکولهای پر مشاهده گردید. کانونهایی از تاولهای خونی **blood blisters** بر روی پوست مشاهده شد که در حقیقت همانژیوم بودند (نگاره ۳). تومورهای لنفاوی منتشر و گره دار بخصوص در کبد، وبه میزان کمتر در کلیهها، دیده شد (نگاره ۴ B تا D). تومورهای بورس کوچک بودند و پس از بررسی دقیق سطح مخاطی اندام دیده شدند. بزرگ شدن اعصاب محیطی مشهود نبود. اندامهای داخلی از جمله کبد، کلیهها، طحال، ریه، قلب، لوزالمعده، پروونتريکولوس، رودهها، ماهیچههای اسکلتی، مغز و اعصاب سیاتیک مورد بررسی گراس قرار گرفتند. بهطور فاحش، استخوان ران چپ دارای یک جرم سفت مایل به سفید $7 \times 8 \times 6$ سانتی متر بود که بهطور کامل دیافیز و متافیز دیستال را درگیر می کرد (نگاره ۴ E و G). در سطح برش، نئوپلاسم جامد، سفید، سفت و به فضای مدولاری نفوذ کرده بود. روی سطح استخوان ران راست یک گره با قطر $4,0$ سانتی متر با همان ظاهر ناخالصی که در نئوپلاسم استخوان ران چپ مشاهده شد وجود داشت (نگاره ۴ F). در فضای مدولاری هر دو استخوان ران و تیپوتارسوس نواحی متعددی با تکثیر استخوانی نئوپلاستیک وجود داشت. بعلاوه، کلیه راست دارای دو ناحیه سفت و سفید متمایل به ندولار نامنظم بود، یکی با قطر $3,0$ سانتی متر و دیگری با $7,1 \times 8,0 \times 2,1$ سانتی متر (نگاره ۴ D). نمونههایی از نئوپلاسم استخوان، کبد، کلیه و طحال جمع آوری شد، در فرمالین بافر 10% درصد ثابت شد و بهطور معمول برای عمل آوری بافت و هیستوپاتولوژی پردازش شد. نمونههای نئوپلاسم استخوانها قبل از پردازش بیشتر در اسید فرمیک دکلسیفیه شدند. مقاطع به ضخامت چهار میکرومتر با هماتوکسیلین و ائوزین (HE)، تری کروم ماسون (Masson's Trichrome)، آبی آلیان

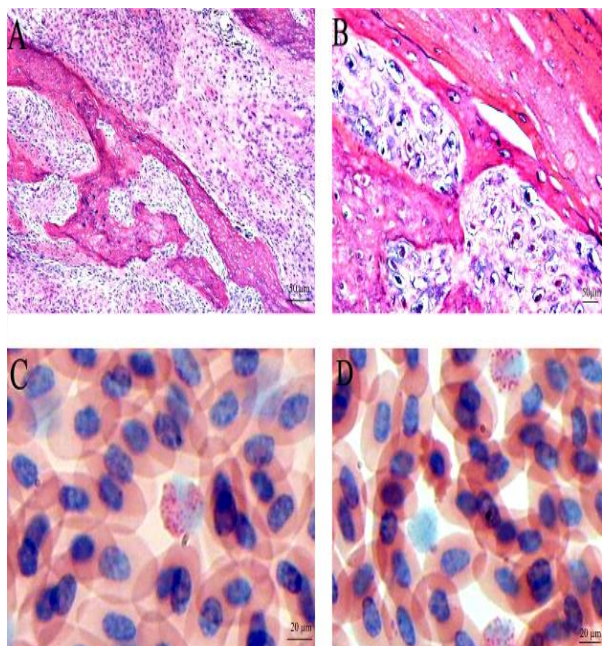
قرار گرفته اند. یک شبکه بهم پیوسته از عروق با سایزهای مختلف در ناحیه عمقی درم دیده می شود (پیکان قرمز). سلولها دارای پلئومورفیک متوسط، با سیتوپلاسم مجزا و ائوزینوفیلیک، هسته های بیضی شکل و هسته های مجزا دیده می شوند. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی $400\times$ برابر، $10 \mu\text{m} = \text{bar}$).



نگاره ۴: یافته های ماکروسکوپی کالبدگشایی در استخوان هوبره مبتلا به استئوسارکوم پلی استونیک. A: هایپر تروفی و فلاسید بودن بافت قلب B و C: درگیری شدید بافت کبد با نواحی ندولار چند کانونه و تکثیر گسترده نئوپلاستیک D: بافت کلیه با نواحی ندولار چند کانونی تکثیر نئوپلاستیک مشابه آنهایی که در اندامهای لگنی یافت می شود. E: تکثیر نئوپلاستیک در استخوان ران چپ، تومور ایجاد شده تمام حفره مدولاری را تا بخش قشری پر نموده است. (فلش نارنجی). F: حضور توده ندولی توپر در استخوان ران سمت راست به رنگ سفید و با قوام سخت (فلش نارنجی). G: رشد ندولار تومور در بخش پشتی متافیز و نیز دیافیز استخوان ران چپ.

در کالبدگشایی پرنده با هیپوتروفی مشخص عضلات قفسه سینه و برجسته شدن استخوان جناغ که در حقیقت بدلیل وقوع میلو سیتوما ی استخوانی (Bone Myelocytoma) بود

گرانول اسیدوفیلیک در سیتوپلاسم در زیر میکروسکوپ
مشخص بودند (نگاره ۵ C و D).



نگاره ۵: یافته‌های میکروسکوپی بافتهای استخوان و خون، A: رشد نفوذی توده نئوپلاسمی بصورت سلول‌هایی که در دسته‌هایی سازمان یافته، در حال تولید مقادیر مشخص ماتریکس استئوئیدی بوده و در این مناطق مینرالیزه شده کنار هم قرار گرفته‌اند. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۲۰۰ برابر $50 \mu\text{m}$ Bars). B: ویژگی‌های سیتولوژیک ایجاد بدخیمی که با نسبت هسته به سیتوپلاسم بالا، کروماتین متراکم و غالب و هسته‌هایی برجسته و هایپراکتیو و همچنین امکان مشاهده سلول‌های دو هسته‌ای مشخص می‌شود. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر $50 \mu\text{m}$ Bars) C و D: افزایش تعداد سلول‌های توموری شبه میلوئیدی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر $20 \mu\text{m}$ Bars).

ایندکس میتوزی در بررسی میدانهای میکروسکوپی با قدرت بالا ۱,۶ بود و ندرتا نیز سلول‌های دو هسته‌ای نادر دیده می‌شد. در ناحیه مرکزی تمایز مشخص بین سلول‌های کندروئید و استئوئید وجود داشت. استخوان ران راست دارای بافت نئوپلاستیک مزانشیمی مشابهی بود که جایگزین مغز استخوان شده و در حال نفوذ به قسمت قشری مغز استخوان بود. که بصورت گره‌هایی بر روی سطح پریوستال

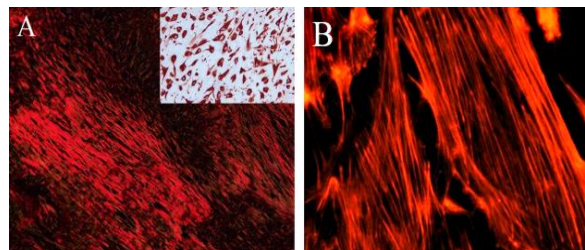
(Alcian Blue) و قرمز پیکروسیریوس (Picrosirius Red) رنگ آمیزی شدند.

مطالعات هیستوپاتولوژیک

به منظور مطالعات هیستوپاتولوژی و نیز به منظور جلوگیری از تغییرات پس از مرگ و جهت تثبیت، بافت‌های جمع آوری شده به‌طور کامل در محلول فرمالین غوطه ور شدند و برای تثبیت مناسب به مدت ۱۰ روز در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس بافت‌ها تحت مراحل شستشو، آبگیری در غلظت‌های صعودی الکل، شفاف سازی در زایلن، اشباع و نفوذ پارافین قرار گرفتند. در ادامه و به‌طور خلاصه، مقاطع با ضخامت ۴ تا ۵ میکرومتر با تکنیک رنگ آمیزی‌های اختصاصی شامل ماسون تری کروم، آلسیان آبی، قرمز پیکروسیریوس و هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند (۲۶). از نظر میکروسکوپی، تومور فمور چپ با تکثیر نئوپلاستیک مزانشیمی نفوذی ضعیف اما مشخص و بدون کپسول دیده شد که کل فضای مغز استخوان را پر کرده و از داخل و خارج از قشر بیرون زده، اما ساختار کلی آن تا حدی حفظ شده بود. نئوپلاسم در حاشیه توسط سلول‌های دوکی با پلئومورفیسم سلولی متوسط، سازمان‌دهی شده در دسته‌ها، ندرتا توام با سیتوپلاسم بازوفیلیک، گاهی ستاره‌ای و با رسوب شدید ماتریکس ائوزینوفیلیک همگن سازگار با استئوئید، در هم قرار گرفته بود این سلول‌ها همچنین از نسبت هسته به سیتوپلاسم بالایی برخوردار بودند، هسته‌ها بزرگ و اکوتولیزه شده با غالبیت موقعیت مرکزی هسته‌ها، آنیزوکاریوزیس متوسط و پلئومورفیسم هسته‌ای بودند (نگاره ۵ A و B). همچنین بررسی گسترش خونی اخذ شده از پرنده وجود سلول‌های توموری میلوئیدی را نشان داد که بصورت سلول‌هایی بزرگ و کروی، با یک هسته گرد یا بیضی شکل در یک طرف سلول و تعداد قابل توجهی

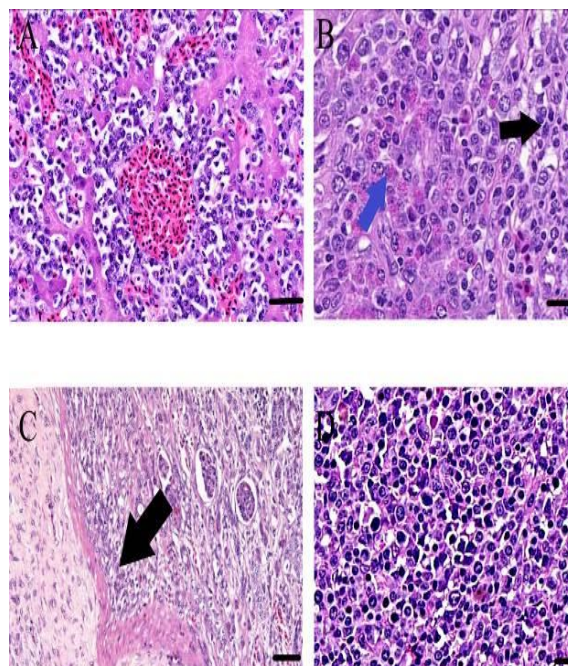
در مطالعات هیستولوژیک بافت کبد از بین رفتن گسترده هپاتوسیتها و هیپرپلازی منتشر مجرای صفراوی همراه با وجود ورقه‌های توپر و گسترده‌ای از لنفوبلاست‌های توموری با هسته‌های متورم بزرگ و یک یا چند هستک برجسته و سیتوپلاسم بازوفیلیک مشاهده گردید که ساختار طبیعی را از بین برده بودند (نگاره ۷). طحال و کلیه نیز مکان‌هایی بودند که انفیلتراسیون گسترده توسط سلول‌های تومور را نشان می‌دادند، کلیه راست دارای یک تکثیر نئوپلاستیکی گسترده و کپسولار مطابق با ویژگی‌های مورفولوژیکی مشاهده شده در نئوپلاسم استخوان ران بود (نگاره ۷). سلول‌های نئوپلاستیک دارای نسبت هسته به سیتوپلاسم بالا و همراه با هسته‌های بزرگ و واکوئله با غالبیت موقعیت مرکزی و برجسته هسته، آنیزوکاریوزیس متوسط و پلئومورفیسم هسته‌ای متوسط بودند. میزان ایندکس میتوزی ۱,۹ بود. کانون‌های متمایزی از سلول‌های کندروئید و استوئید همراه با رسوب مشخص ماتریکس استوئیدی خارج سلولی وجود داشت. سایر اندام‌ها مانند بورس، ریه‌ها، روده هاف قلب، تیروئید و پانکراس فقط به میزان اندکی درگیر بودند و فقط بصورت گراس مورد بررسی قرار گرفتند.

بیرون زده شده بود. کانون‌های متمایزی از سلول‌های کندروئید و استوئید همراه با رسوب مشخص ماتریکس ائوزینوفیلیک همگن و سازگار با خصوصیات سلول‌های استوئیدی در همه بخش‌ها وجود داشت. رنگ آمیزیهای اختصاصی شامل ماسون تری کروم، آلسیان آبی و قرمز پیکروسیرپوس، رسوب کلاژن نوع I که توسط سلول‌های نئوپلاستیک سنتز شده بود و بعنوان علامت مشخصه ماتریکس استوئیدی تلقی شده و امکان تشخیص بهتر نواحی با تمایز غضروفی و رسوب مواد معدنی را فراهم می‌سازد را نشان داد. (نگاره ۶). رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی تومور اولیه استخوان و متاستاز آن در بافت کلیه با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ضد ویمنتین جوجه Anti-Vimentin Antibody, clone VIM 3B4 (سیگما الدریج، ایالات متحده) در رقت ۱:۱۰۰ انجام شد و در طی آن ویمنتین شدیداً توسط سلول‌های نئوپلاستیک بیان شد (نگاره ۶). در مجموع، این یافته‌ها با مشخصات استئوسارکوم پلی استئوتیک، به دلیل وجود مکان‌های تکثیر متعدد نئوپلازی در استخوان‌ها و مغز استخوان، همراه با متاستاز کبد و کلیوی، همراه بودند. علاوه بر این، قطعات نئوپلاسمی از بافتهای کبد، طحال و کلیه در طی کالبدگشایی جمع‌آوری و برای ارزیابی بیشتر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.



نگاره ۶: A و B: رسوب کلاژن نوع I سنتز شده توسط سلول‌های نئوپلاستیک. (رنگ آمیزی پیکروسایروس رد Picrosirius Red بزرگنمایی A: ۲۰۰ برابر و B: ۴۰۰ برابر، میکروسکوپ پلاریزان Nikon مدل Eclipse E200 POL) اینست تصویر A: رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی، بروز قوی ویمنتین در سلول‌های نئوپلاستیک (رنگ آمیزی ویمنتین، بزرگنمایی ۲۰۰ برابر).

پکن، چین) به cDNA رونویسی معکوس شد. برای استخراج DNA از بافت کبد و کلیه استفاده شد. دلیل انتخاب این دو بافت تکثیر لنفوی شدید در آنها بود. ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت دالبکو مودیفاید ایگل مدیوم (DMEM) (ترموفیشر، ایالات متحده) قرار گرفتند و سپس با استفاده از دستگاه سونیکاتور (التراسونیک هموژنایزر) (توماس ساینترفیک، ایالات متحده) شکسته شدند. DNA با استفاده از یک عامل عامل کائوتروپ و بی نظمی دوست (یدید سدیم) و سپس جذب توسط سیلیس و بر اساس روش توضیح داده شده توسط بلوم و همکاران در سال ۲۰۱۶ استخراج شد (۲۷). سپس نمونه‌های DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در مرحله بعد PCR برای تشخیص نوع سویه شامل ALV-A/B/K/J، MDV و REV انجام شد. به این منظور بافت همورنه شده، تحت سانتریفیوژ گرادیان در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا مایع رویی به دست آید. سپس مایع رویی با سلول‌های تک لایه رده سلولی فیبروبلاست مرغ (DF-1) آلوده شدند. (chicken fibroblast cell line) سپس از میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال (هم کانونی) (CLSM) (Nikon A1R، نیکون، ژاپن) برای تشخیص ALV-J با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال Anti-Avian Leukosis Virus Subgroup J (ALV-J) gp85 [G2] خاص علیه پروتئین‌های ALV-J SU، (ترموفیشر، ایالات متحده) و از آنتی بادی Cy3 Conjugated Goat Anti-Mouse IgG secondary antibody (Catalog # BA1031) (H+L) (ترموفیشر، ایالات متحده) بعنوان آنتی بادی ثانویه همانطور که توسط پانگ و همکاران در سال ۲۰۱۹ توضیح داده شد، استفاده شد (۲۸). سپس RNA کامل در فاصله زمانی ۲۴ تا ۹۶ ساعت پس از القای عفونت برای تعیین میزان تنوع تعداد کپی (کپی نامبر) ALV-J استخراج شد. پرایمرهای تشخیص env ALV-J برای تجزیه و تحلیل بار ویروسی و سویه کترلی HPRS103 با استفاده از دستگاه Light



نگاره ۷: A: لنفوسیت‌های نئوپلاستیک سینوس‌های کبدی را در اطراف ورید مرکزی با اشکال میتوتیک پر کرده‌اند در بعضی از قسمت‌ها بقایای سلول‌های نکروزه نیز دیده می‌شود. اشکال میتوتیک توام با حضور سلول‌های آپوپتوز شده متعدد در جمعیت لنفوسیت‌های نئوپلاستیکی وجود دارد. این سلول‌های نئوپلاستیک در لومن ورید مرکزی نیز وجود دارند (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر Bars = 20 μm). B: دو نوع سلول توموری در این نمای میکروسکوپی دیده می‌شود. مورد اول سلول‌های میلوئیدی با گرانول‌های سیتوپلاسمیک ائوزینوفیلیک (پیکان آبی) مورد دوم حضور لنفوسیت‌های نئوپلاستیک (پیکان سیاه) است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۲۰۰ برابر Bars = 20 μm). C: تکثیر گسترده سلول‌های نئوپلاستیک متاستاتیک (پیکان سیاه) در کلیه راست که موجب فشردن نمودن توپولها و تغییر ساختار بافتی در کلیه شده است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۲۰۰ برابر Bars = 20 μm). D: طحال توسط جمعیت زیادی از لنفوسیت‌های پلئومورفیک و نئوپلاستیک به بافت طحال نفوذ کرده است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۲۰۰ برابر Bars = 20 μm).

استخراج DNA

DNA کامل با استفاده از معرف Tri Reagent® (سیگما) الدریج، ایالات متحده) استخراج شد، سپس با استفاده از FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix (تیان ژن،

Cycler 96 Real-Time PCR (روش، بازل، سوئیس)

طراحی شدند.

جدول ۱: توالی پرایمرها برای سکوسینگ ژنوم کامل

ردیف	پرایمر	توالی	طول (bp)
۱	1A	5' -TGTGTAGTGTTATGCAATACTC-3'	۱۱۶۱ bp
۲	1B	5' -TGTAAGCCCTTGGTCCTGAC-3'	۱۱۲۰ bp
۳	2A	5' -GATCACAAGACTGGCTGATAC-3'	۱۲۱۵ bp
۴	2B	5' -GAGCGCGCAAGTCATGCAATA-3'	۱۱۸۱ bp
۵	3A	5' -AGGACTGTTGCGCTACATCTGGC-3'	۱۱۴۸ bp
۶	3B	5' -AACCTGGCACTTCAGAATGA-3'	۱۱۳۴ bp
۷	4A	5' -TACTTCTGCTGTGGCCGACAA-3'	۱۲۱۹ bp
۸	4B	5' -CGCAGCAAGGGTGTCTTCTCCG-3'	۱۱۶۵ bp
۹	5A	5' -CGCGTGGTTATTATTTCCGTCGTCC-3'	۱۲۱۷ bp
۱۰	5B	5' -ATGAAGCCTTCCGCTTCATGCAGGT-3	۱۱۱۸ bp

جدول-۲: اطلاعات سویه‌های مرجع ALV و هویت نوکلئوتیدی به اشتراک گذاشته شده با سویه جداسازی شده.

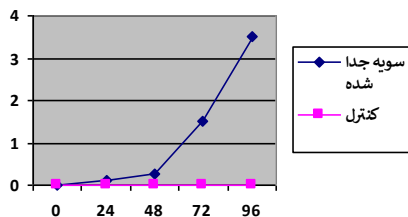
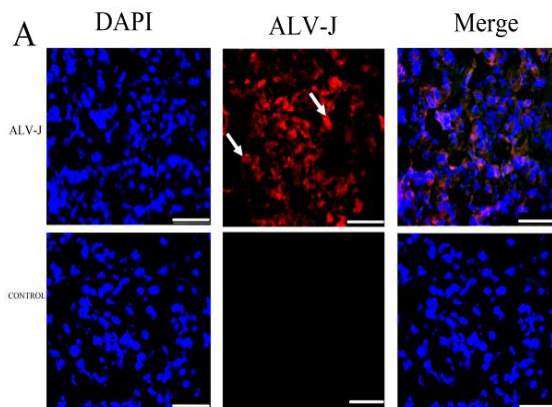
Subgroup	ALV strains	GenBank Accession Numbers	Whole genome	Gag	Pol	Env
ALV-J	YZ9902	HM235670.1	۹۳,۶	۹۳,۶	۹۶,۰	۹۱,۷
ALV-J	CAUHM01	JF932000.1	۹۴,۵	۹۳,۹	۹۷,۱	۹۲,۱
ALV-J	CAUTS01	JF932002	۹۴,۶	۹۳,۵	۹۷,۰	۹۲,۷
ALV-J	CAUXT01	JF932003	۹۴,۶	۹۳,۶	۹۷,۰	۹۲,۳
ALV-J	GD18SG01	MT538242	۹۳,۲	۹۳,۴	۹۶,۳	۹۱,۶
ALV-J	GD1109	JX254901	۹۴,۸	۹۳,۶	۹۷,۲	۹۳,۰
ALV-J	GD1408	KU500037	۹۳,۲	۹۲,۷	۹۶,۳	۹۱,۰
ALV-J	GDHN-YH1	MK683480	۹۳,۹	۹۳,۵	۹۷,۳	۹۱,۷
ALV-J	GDHN-YM1	MK683478	۹۴,۱	۹۳,۵	۹۷,۱	۹۱,۸
ALV-J	GX14NN02	MN735293	۹۴,۶	۹۳,۹	۹۷,۲	۹۲,۵
ALV-J	HAY013	HM235665	۹۳,۶	۹۳,۸	۹۶,۰	۹۱,۷
ALV-J	HPRS-103	Z46390	۹۶,۹	۹۷,۲	۹۷,۹	۹۶,۴
ALV-J	JL09L01	HQ148555	۹۲,۶	۹۴,۲	۹۶,۰	۸۶,۷
ALV-J	JL093-1	JN624878	۹۴,۵	۹۴,۴	۹۶,۹	۹۲,۸
ALV-J	JS09GY3	GU982308	۹۴,۹	۹۴,۵	۹۷,۰	۹۲,۵
ALV-J	JS09GY6	GU982310	۹۴,۸	۹۴,۴	۹۶,۹	۹۲,۶
ALV-J	JS18YZ03	MN735305	۹۴,۷	۹۴,۵	۹۷,۴	۹۱,۶
ALV-J	NX-0101	DQ115805	۹۶,۱	۹۶,۹	۹۷,۹	۹۶,۴
ALV-J	SCAU11- XG	KC149971	۹۳,۶	۹۳,۶	۹۶,۳	۹۱,۴
ALV-J	SCAU - HN06	HQ900844	۹۵,۲	۹۳,۹	۹۷,۵	۹۳,۳
ALV-J	SCGS-1	JQ396302	۹۴,۲	۹۳,۴	۹۷,۸	۹۱,۱

ALV-J	SDAU1001	JN389517	۹۴,۷	۹۳,۷	۹۶,۹	۹۲,۱
ALV-J	SDAU1002	JN389518	۹۴,۷	۹۳,۸	۹۷,۱	۹۲,۵
ALV-J	SDAU1005	KT156668	۹۵,۹	۹۴,۴	۹۷,۷	۹۲,۸
ALV-J	SDAU1102	KU159178	۹۵,۰	۹۳,۹	۹۷,۶	۹۲,۶
ALV-J	TBC-J4	MT409624	۹۴,۵	۹۳,۷	۹۷,۳	۹۳,۰
ALV-J	TBC-J6	MT409625	۹۴,۳	۹۴,۵	۹۶,۶	۹۳,۱
ALV-J	WB11098	WB11098	۸۴,۷	۹۴,۴	۹۷,۴	۵۶,۳
ALV-A	SDAU09E1	HM452341	۸۴,۱	۹۴,۳	۹۶,۵	۵۶,۴
ALV-A	RAV-1	MF926337	۸۳,۵	۹۳,۳	۹۶,۹	۵۶,۹
ALV-A	SDAU09C1	HM452339	۸۳,۳	۹۳,۳	۹۶,۶	۵۶,۶
ALV-A	SDAU09C3	HM452340	۸۲,۸	۹۵,۱	۹۶,۷	۵۶,۹
ALV-B	SDLYB1902	MT648688	۸۲,۸	۹۵,۱	۹۶,۸	۵۷,۰
ALV-B	SDLYB1901	MT648687	۸۲,۸	۹۵,۱	۹۶,۸	۵۷,۰
ALV-K	TW-3593	HM582658	۸۳,۶	۹۴,۳	۹۷,۳	۵۶,۴
ALV-E	AF227	MF817820	۸۳,۸	۹۴,۴	۹۷,۶	۵۶,۳
ALV-E	AF229	MF817821	۸۳,۹	۹۴,۵	۹۷,۶	۵۶,۳
ALV-E	DL00766	MH454773	۸۳,۷	۹۴,۶	۹۷,۷	۵۶,۹
ALV-E	RAV0	MF817822	۸۳,۹	۹۴,۶	۹۷,۶	۵۶,۶
ALV-K	ALV-K-env J	MK638922	۸۶,۲	۹۴,۵	۹۷,۳	۵۶,۲
ALV-K	GD14LZ	KU605774	۸۳,۴	۹۳,۷	۹۶,۹	۵۶,۱
ALV-K	GDFX0601	KP686142	۸۳,۸	۹۴,۵	۹۷,۶	۵۶,۱
ALV-K	GDFX0602	KP686143	۸۳,۸	۹۴,۴	۹۷,۵	۵۶,۳
ALV-K	GDFX0603	KP686144	۸۳,۸	۹۴,۵	۹۷,۵	۵۶,۴
ALV-K	JS13LY19	MG770235	۸۳,۵	۹۴,۵	۹۷,۴	۵۶,۲
ALV-K	JS14CZ02	KY490696	۸۳,۶	۹۴,۲	۹۷,۲	۵۶,۳
ALV-K	SDAUAK-11	KY773911	۸۱,۵	۹۴,۳	۹۷,۵	۵۶,۴
ALV-K	SDAUAK-12	KY773912	۸۱,۵	۹۴,۶	۹۷,۶	۵۶,۴

pGEM®-T Easy Vector Systems (کمپانی پرومگا، مادیسون، ایالات متحده) متصل شدند. توالی‌های ژنی جزئی و کامل از طریق روش ClustalW در نرم‌افزار MegAlign Pro برای آنالیز همسانی هم‌تراز شدند. آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس روش اتصال به همسایگی با ۱۰۰۰ بوت استرپ با استفاده از نرم‌افزار MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 و بر اساس روش سوان استورم و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام

بار ویروسی هر کدام از بافتها با استفاده از منحنی استاندارد ارائه شده توسط هی و همکاران در سال ۲۰۲۱ محاسبه گردید (۲۹). در ادامه RNA کامل نمونه سلول‌های مثبت ALV-J استخراج شده و به‌طور معکوس به cDNA رونویسی شد تا ژنوم کامل جدایه‌های ویروسی را تکثیر کند. سپس قطعات ژنومی ویروسی با استفاده از پنج جفت پرایمر (جدول ۱) از طریق کیت پاکسازی PCR (کیژن، هیلدن، آلمان) برای خالص سازی آمپلیکون‌ها تکثیر شدند. سپس آمپلی‌کن‌ها برای آنالیز توالی‌یابی بیشتر به وکتور

می‌دهد و ویروس متعلق به ALV-J است. سپس سلول‌های DF-1 با این سویه جدا شده برای آنالیز (Confocal Laser Scanning Microscopy) CLSM و میزان ظرفیت تکثیری آلوده شدند. سنجش CLSM نشان داد که سلول‌های DF-1 آلوده به ویروس، با بار ویروسی که منحنی رشد معمولی را نشان می‌دهد نور فلورسنت قابل توجهی تولید می‌کنند (نگاره ۸).



نگاره ۸: جداسازی ویروس، A: شناسایی توسط CLSM سویه جدا سازی شده. آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی ALV-J به عنوان آنتی بادی اولیه و از آنتی بادی CY3 به عنوان آنتی بادی ثانویه استفاده شد. منحنی رشد ویروس در DF-1 در فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت توسط تکنیک qPCR شناسایی شد.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک سویه جدا شده

ژنوم کامل سویه جدا شده با استفاده از آغازگرهای ۵ قطعه‌ای تکثیر شدند (جدول ۱). ژنوم ویروسی سویه جدا شده حاوی ۷۶۱۸ نوکلئوتید بود؛ و دارای هویت ۹۶٫۹ درصدی با سویه نمونه اولیه HPRS103 و هویت ۹۶٫۱

شد (۳۰). شماره دسترسی این سویه‌ها در بانک ژن در جدول ۲ آمده است (جدول ۲).

ارزیابی بیماری‌زایی و پاتوژنیته

تعداد ۱۵ جوجه یک روزه بدون پاتوژن خاص (SPF) در شرایط کاملاً استریل و کنترل شده نگهداری و به‌طور تصادفی به گروه‌های کنترل، vir-1 و HPRS103 برای آنالیز پاتوژنیسته vir-1 تقسیم شدند. جوجه‌ها میزان TCID₅₀ (۲۰۰ میکرولیتر) از ماده تزریقی محتوی HPRS103 و vir-1 همراه با محیط کشت DMEM را به روش تزریق داخل صفاقی بعنوان گروه کنترل دریافت کردند. وزن بدن جوجه‌ها در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸ پس از آلودگی (dpi) ثبت شد. علاوه بر این، نمونه‌های سرم و سواب کلوک در این روزها برای تشخیص P27 جمع‌آوری شد. سپس در سن ۳۰ روزگی، سه جوجه از هر گروه به‌طور تصادفی انتخاب و یوتانایز شده و بافت‌ها برای تجزیه و تحلیل شاخصه‌های ارگان‌های ایمنی، بار ویروسی و ضایعات هیستوپاتولوژیک جمع‌آوری شدند. برای ارزیابی آماری از طریق بسته نرم افزاری Prism 9.0 (نرم افزار CA, La Jolla, GraphPad) آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد ارائه شدند. $P < 0.01$ و $P < 0.05$ نشان دهنده تفاوت و تفاوت معنی دار بود. علائم **، *** و **** به ترتیب $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.001$ را نشان می‌دهند.

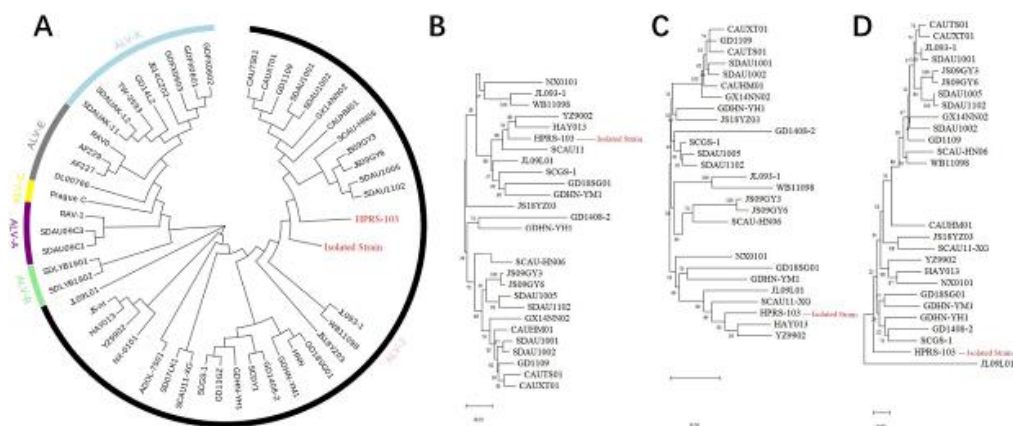
نتایج

تشخیص و جداسازی ویروس

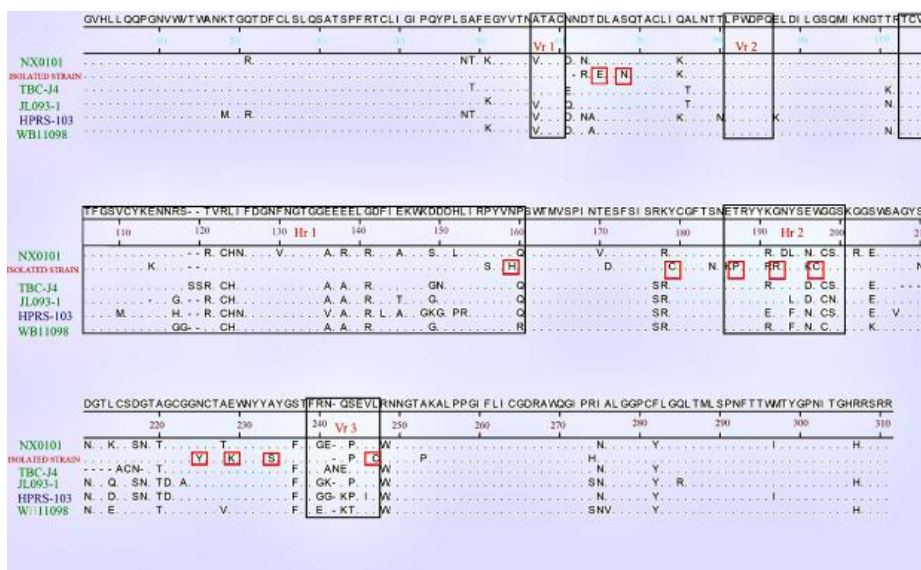
نتایج PCR نشان داد که شش جوجه از ده جوجه پس از تشخیص با پرایمر اختصاصی ALV-J قطعه خاصی تولید کردند. امدار بررسی با پرایمرهای اختصاصی ALV-A/B/K، MDV و REV، قطعه‌ای تولید نکردند که نشان

سویه نمونه اولیه ALV-J HPRS103 اشتراک دارند (نگاره ۹).

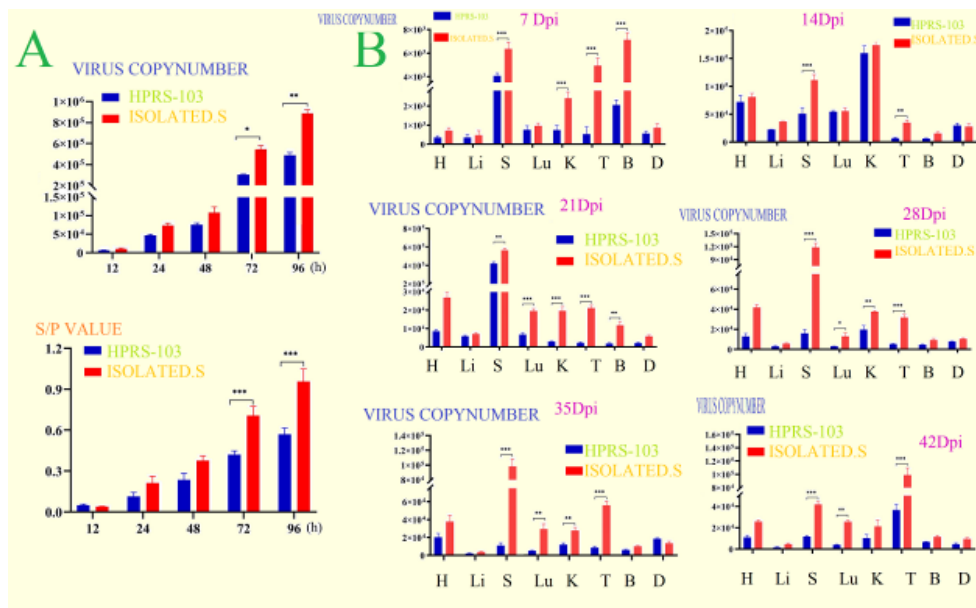
درصدی با NX-0101 بود (جدول ۲). شاخه تکاملی نشان داد که منشا سویه جدا شده می تواند سویه HPRS103 باشد. تجزیه و تحلیل بر اساس ژن های ALV-J gag, pol, env، نشان داد که آنها به ترتیب ۹۶،۴٪ - ۹۷،۹٪، ۹۷،۲٪ با



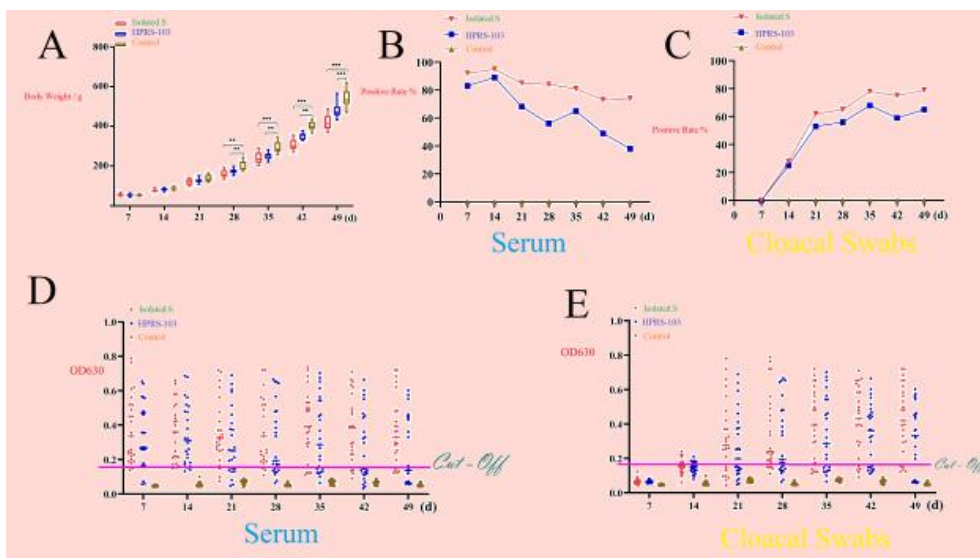
نگاره ۹: آنالیز فیلوژنتیکی و میزان همسانی سویه جدا شده. (A) آنالیز فیلوژنتیک و همسانی سویه جدا شده درخت فیلوژنتیکی بر اساس ژنوم کامل سویه جدا شده ترسیم گردیده است (۷۶۱۴ تا ۷۶۲۵ جفت باز). ناحیه سیاه نشان دهنده ALV-J، ناحیه آبی نشان دهنده ALV-K، ناحیه سبز نشان دهنده ALV-B، ناحیه ارغوانی نشان دهنده ALV-A و ناحیه زرد رنگ نشان دهنده ALV-C و ناحیه خاکستری نشان دهنده ALV-E با استفاده از روش اتصال به همسایگی با ۱۰۰۰ بوت استرپ با استفاده از نرم افزار MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 ترسیم شده است. نوارهای مقیاس متناسب با فاصله ژنتیکی هستند. مقادیر Bootstrap > 70% در هر گره نشان داده شده است.



نگاره ۱۰: جهش درتوالی های اسید آمینه پروتئین اس یو. گلیکوپروتئین شماره ۸۵ ALV-J با استفاده از نرم افزار Megalign شناسایی و با استفاده از روش Clustal W ارزیابی شد.

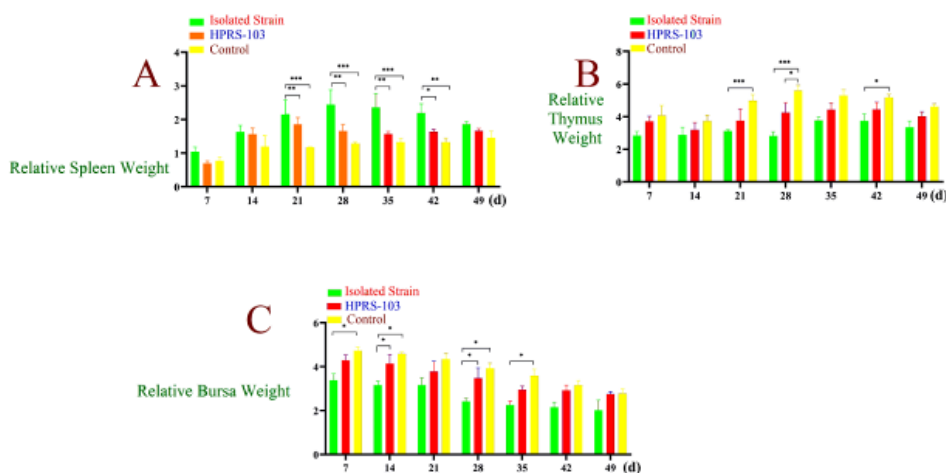


نگاره ۱۱: تعیین لود ویروسی بافتها در شرایط *in vivo* و *in vitro* (A) مقایسه بارهای ویروسی ALV-J و S/Pvalue مربوط به پروتئین P27 در سلول‌های DF-1 جوجه‌های آلوده شده با سویه جداسازی شده و نیز سویه HPRS103 در دوازده، بیست و چهار، چهل و هشت، هفتاد و دو و نود شش ساعت پس از تلقیح Hours post inoculation (hpi) به ترتیب توسط روشهای qPCR و ELISA. (B) مقایسه لود ویروسی ALV-J در اندام‌های مختلف جوجه‌های آلوده به سویه جداسازی شده و سویه HPRS103 و گروه کنترل به ترتیب در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱، ۳۵، ۴۲ و ۴۹ پس از تلقیح Days post inoculation (dpi) با استفاده از تکنیک qPCR. (H) قلب، (Li) کبد، (S) طحال، (LU) ریه، (K) کلیه، (T) تیموس، (B) بورس فابرسیوس، (D) دوازده. داده‌ها با آزمون t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقدار $P < 0.05$ بصورت معنی دار در نظر گرفته شد. مقادیر $P < 0.05, 0.01$ و 0.001 به ترتیب با *، ** و *** نشان داده شده است.



نگاره ۱۲: تعیین مقادیر ویروسی ALV-J و شدت ویروسی کلوک و میزان کاهش وزن بدن در جوجه‌های آلوده. مقایسه وزن اندازه گیری شده بدن جوجه‌ها در گروه‌های مربوط به سویه جداسازی شده، HPRS103 و گروه کنترل در مقاطع زمانی مختلف. (B) مقایسه میزان موارد مثبت ویروس ALV-J در سرم جوجه‌ها در گروه‌های مربوط به سویه جداسازی شده، HPRS103 و گروه کنترل در مقاطع زمانی مختلف. (C) مقایسه سطح آنتی ژنی پروتئین P27

ویروس لکوز طیور در سرم جوجه‌ها در گروه‌های مربوط به سویه جداسازی شده، HPRS103 و گروه کنترل در مقاطع زمانی مختلف، تعیین شده با روش الایزا (D): مقایسه موارد مثبت پروتئین P27 ویروس لکوز طیور در سواب اخذ شده از کلواک جوجه‌ها در گروه‌های مربوط به سویه جداسازی شده، HPRS103 و گروه کنترل در مقاطع زمانی مختلف، تعیین شده با روش الایزا (E): مقایسه سطح آنتی ژنی پروتئین P27 ویروس لکوز طیور در سواب اخذ شده از کلواک جوجه‌ها در گروه‌های مربوط به سویه جداسازی شده، HPRS103 و گروه کنترل در مقاطع زمانی مختلف، تعیین شده با روش الایزا.



نگاره ۱۳: تغییر وزن نسبی ارگان‌های مختلف سیستم ایمنی. (A): تغییر وزن نسبی طحال. (B): تغییر وزن نسبی تیموس. (C): تغییر وزن نسبی بورس فابرسیوس. جوجه‌ها در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵، ۴۲ و ۴۹ پس از تلقیح توزین شدند و میانگین وزن نسبی ارگان‌های مختلف سیستم ایمنی آنها به شرح جدول فوق مورد ارزیابی قرار گرفت.

ویژگی‌های ژن‌های کد کننده ایزوله‌های سویه جدا شده: جهش‌های نوکلئوتیدی در سویه جدا شده عمدتاً در ناحیه env اتفاق افتاد. طول ژن env در سویه جدا شده حدود ۱۶۲۳ نوکلئوتید بود. کل ژن env دارای جهش‌های نوکلئوتیدی زیادی به‌طور عمده به ترتیب در نواحی heptad repeat sub domains variable region 1 (vr-1) و (hr1&hr2) و variable region 3 (vr-3) از گلیکوپروتئین ۸۵ بود که در طی آن به ترتیب یک، سه و یک جایگزینی اسید آمینه به ترتیب در ناحیه hr2، hr1 و ناحیه vr3 رخ داد (نگاره ۱۰).

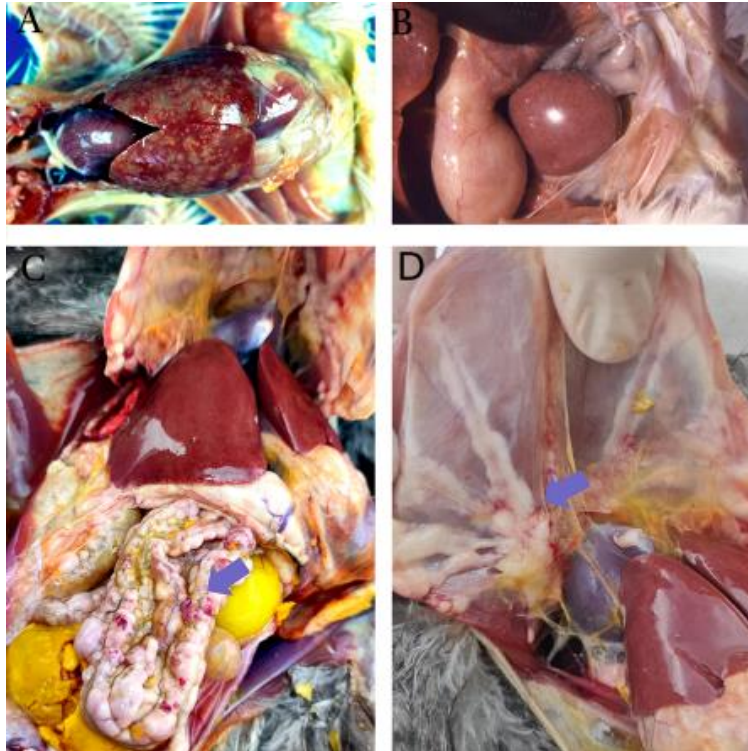
تجزیه و تحلیل بیماری‌زایی سویه جدا شده: سویه جدا شده دارای قابلیت تکثیر قوی تر و سریع‌تر از HPRS103 در سلول‌های DF-1 بود (نگاره A۱۱). لود ویروسی سویه جدا شده در ارگان‌های سیستم ایمنی

(طحال، تیموس و بورس فابرسیوس) به‌طور قابل توجهی بالاتر از HPRS103 بود (نگاره B۱۱). در مقایسه با جوجه‌های آلوده به HPRS103، کاهش وزن، ویرمی و شدیدنگ ویروس به‌طور قابل توجهی در جوجه‌های آلوده به سویه جدا شده شدیدتر بود (نگاره ۱۲). میانگین وزن نسبی ارگان‌های سیستم ایمنی (به جز طحال) در جوجه‌های آلوده به سویه جدا شده به‌طور قابل توجهی کمتر از جوجه‌های آلوده به HPRS103 بود (نگاره ۱۳).

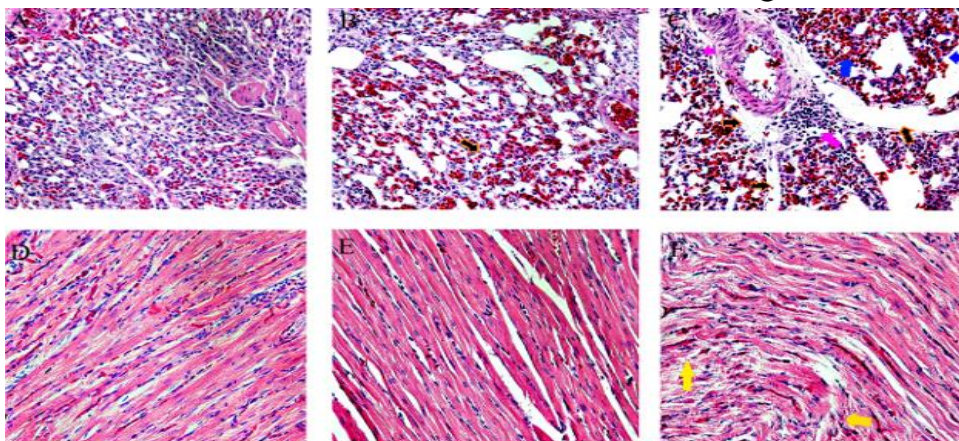
سلول‌های غیر توموری مورد ارزیابی هیستوپاتولوژیکی قرار گرفتند و مشخص شد جوجه‌های آلوده به سویه جدا شده میزان بیشتری از پارگی فیبرهای میوکاردا و نفوذ لنفوسیتی به رگ‌های لنفاوی ریوی را نسبت به جوجه‌های آلوده به HPRS103 نشان دادند (نگاره ۱۴). این نتایج نشان داد که سویه ویروسی جدا شده توانایی همانند سازی و انتقال

عملکرد قلبی ریوی شود.

قوی‌تری نسبت به HPRS103 دارد و بنابراین می‌تواند باعث سرکوب جدی‌تر سیستم ایمنی و آسیب بیشتر



نگاره ۱۴: یافته‌های کالبد گشایی جوجه‌های تلقیح شده با سویه جدا سازی شده. (A): ندول‌های توموری سفید رنگ قابل مشاهده در سطح کبد (بسیار شبیه به ندولهای یافت شده بر روی کبد هوبره). (B): اسپلنومگالی در بافت طحال. (C): ندول‌های توموری سفید رنگ بر روی پرده مزانتریک. (D): لایه‌های سفید رنگ از توده‌های توموری بر روی جناغ.



نگاره ۱۵: بررسی هیستوپاتولوژیک نمونه‌های بافتی جوجه‌های تلقیح شده. (A): بافت ریه گروه کنترل. (B): پرخونی مویرگهای ریوی (پیکان نارنجی)، (C): اینفیلتراسیون لنفوسیتها در اطراف عروق ریوی. (پیکان نارنجی نشان دهنده ادم ریوی است، پیکان صورتی نشان دهنده نفوذ لنفوسیتها به بافت ریه است و پیکان آبی رنگ نشان دهنده پرخونی عروق ریوی را نشان می‌دهد). (D): بافت قلب گروه کنترل، (E): بافت قلب گروه تلقیح شده با سویه HPRS103 که هیچگونه ضایعه‌ای را ایجاد نکرده است. (F): بافت قلب گروه تلقیح شده با سویه جدا سازی شده (پیکانهای زرد پارگی فیبرهای میوکارد را نشان می‌دهد).

بحث

پرنده هوبره پرنده تقریباً ناشناخته صحرائی در حال انقراض است که دامنه زیستی آن از شمال آفریقا تا آسیای مرکزی را شامل می‌شود. سه زیرگونه در حال حاضر با توزیع جغرافیایی و مورفولوژی شناخته شده‌اند (۳۱). جمعیت هوبره‌ها در سال‌های اخیر به علت توسعه کشاورزی مکانیزه، شکار، کاهش مساحت زیستگاهها، چرای بی رویه، احداث جاده‌ها، ساخت و ساز و گسترش زیر ساختهای توسعه شهری از جمله دکل‌های برق، کابل‌های مخابراتی و ... به شدت کاهش یافته است (۳۲). اجرای برنامه‌های اصلاح نژاد و حفاظتی گامی کلیدی برای تضمین بقای پایدار بسیاری از گونه‌های در معرض خطر است (۳۳). اکنون بیش از ۲۰ سال است که هوبره‌ها برای اهداف حفاظتی در اسارت پرورش داده می‌شوند (۳۴)؛ اما این برنامه‌های پرورش در اسارت و معرفی مجدد بواسطه مرگ و میر و عوارض ناشی از بیماریهای مختلف عفونی بویژه از آنجایی که دانش در مورد پاتوژن‌های مؤثر بر آن گونه‌ها معمولاً کمیاب است شدیداً بر عملکرد پرورشی این پرندگان تأثیر گذاشته و اهداف برنامه‌های حفاظتی را به خطر می‌اندازد و لذا این برنامه‌ها بطور کلی موفقیت محدودی در احیای تعداد جمعیت این گونه منحصر به فرد داشته‌است. برای مثال مشاهدات میدانی نشان می‌دهد که بیماری آبله که توسط ویروس‌های آبله پرندگان (APV) ایجاد می‌شود، علی‌رغم اجرای بسیار دقیق واکسیناسیون و اصول امنیت زیستی، به‌طور مرتب در پروژه‌های حفاظتی هوبره ظاهر می‌شود (۳۵)؛ بنابراین شناخت عوامل خطر و آسیب رسان جهت حفظ بقای پایدار این گونه ضروری است. از طرف دیگر با توجه به جمعیت وحشی این پرنده که در حال حاضر کاهش یافته است، هر مجموعه‌ای که جهت نگهداری و تکثیر در اسارت احداث می‌گردد بایستی دقیقاً بر طبق آخرین استانداردهای موجود و با تکیه بر علم

روز عمل نماید تا شانس زیادی برای بقا و معرفی مجدد داشته باشد و نهایتاً تبدیل به یک برنامه حفاظتی ارزشمند شود؛ بنابراین سوال کلیدی این است که آیا منافع حاصل از رهاسازی حیوانات پرورش یافته در اسارت بیشتر از تلفات پرندگان وحشی است که برای شروع پرورش در اسارت اسیر شده‌اند؟ اول از همه، این برنامه باید بتواند پرندگان زیادی را پرورش دهد و مطمئن باشد که آنها دقیقاً مانند پرندگان وحشی و در زیستگاههای اصلی خود تولید مثل می‌کنند سپس به فکر اجرایی نمودن طرح خود باشند. متأسفانه نگهداری و تولید مثل در اسارت بسیار دشوار است. هوبره‌ها که توسط دانشمندان به‌عنوان یک «گونه چالش برانگیز مستعد استرس و آسیب» توصیف می‌شوند، همواره در معرض حوادث و شکستگی‌های استخوانی در اسارت هستند. همانگونه که چندین مورد شکستگی‌های استخوانی در جمعیت هوبره‌های باغ وحش ارم تهران در طی چند سال گذشته اتفاق افتاده و با موفقیت درمان شده است. این پرندگان همچنین دارای تاخیر در بلوغ و باروری کم هستند. این امر علاوه بر خطرات عمومی‌تر مرتبط با پرورش در اسارت، خطرات مهمتری نیز از قبیل از دست دادن تنوع ژنتیکی، اهلی‌سازی (از طریق انتقال صفاتی که در طبیعت مضر است)، عدم دستیابی به سطوح پایه‌ای و نرخ بقای ضعیف پس از معرفی مجدد را نیز به دنبال دارد (۳۶). لذا با توجه به اثربخشی بالقوه یک برنامه پرورش در اسارت برای هوبره‌ها که در حال حاضر بسیار تیره و تار به نظر می‌رسند، ضروری است که چنین طرح‌هایی برای حفاظت در محل تحت ارزیابی دقیق قرار گیرد. بخصوص از دیدگاه پزشکی باید وضعیت پاتوژن‌ها و مهمترین عوامل تهدید کننده آنها دقیقاً بررسی گردد. در این مطالعه ضمن شناسایی ویروس لکوز پرندگان در این پرنده اقدام به جداسازی یک سویه جدید شد. ژانگ و همکاران دو سویه ALV-J جدا شده در تبتی جدا شد. با این حال، منشأ و

همانژیوم و میلوستوم شدید را القا کند (۲۰). ژو و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱ در چین برای اولین بار تشخیص و جداسازی ویروس لوکوز پرندگان را از جوجه‌های تبتی گزارش کردند. نتایج آنها حذف ۸ اسید آمینه را در بخش ۳-۱ انتهای ژن pol سویه‌های جدید را نشان داد، همچنین ۲ بخش حذف شده در ناحیه hr2 پروتئین gp85 شناسایی شد. در میان همه سویه‌ها، چندین جهش در توالی اصلی سایت اتصال پرایمر و ناحیه ترجمه‌نشده که از ویروس مرتبط با Rous آمده بود، شناسایی شد (۳۸). این اولین مطالعه‌ای است که منشا ویژگی‌های زیست‌شناسی خاص و بیماری‌زایی سویه جهش یافته و جداسازی شده از ALV-J را در هوبره تشریح می‌کند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی در سطح ژن نشان داد که این سویه جداسازی شده از سویه HPRS103 منشا گرفته است و در همان شاخه با سویه‌های JS18YZ03 و WB11098 قرار گرفته است. این سویه‌های ALV-J از JS18YZ03 سرچشمه گرفته‌اند. متاسفانه مطالعات مستندی در خصوص منشا JL093-1 و WB11098 در ایران انجام نشده و منشا آنها در ایران نامشخص است. اما بطور کلی می‌توان اینگونه عنوان نمود که سویه جدا شده ممکن است نوع تکاملی JS18YZ03 باشد. با این حال، مطالعات بیشتر باید چگونگی رسیدن این سویه به باغ وحش ارم تهران و هوبره‌ها را بررسی کند. گلیکو پروتئین ۸۵ از ویروس لکوز پرندگان، میزان بیماری‌زایی و همچنین وسعت و تنوع میزبانها را تعیین کرده و توسعه می‌دهد (۳۹). ناحیه vr3 می‌تواند گیرنده‌های خاص را تشخیص دهد (۴۰)، در حالی که مناطق hr1 و hr2 عمدتاً اتصال به گیرنده‌های سطحی سلول میزبان را ترویج می‌کنند (۴۱). علاوه بر این، جهش در گلیکو پروتئین ۸۵ می‌تواند دامنه میزبان و بیماری‌زایی ویروس را تغییر دهد (۴۲). در این مطالعه، حذف و جایگزینی اسیدهای آمینه در مناطق hr1، hr2، vr3 و vr1

بیماری‌زایی جدایه‌های ALV-J تبتی ناشناخته است (۹). هایکین و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱ در چین و طی یک بررسی اپیدمیولوژیک سیستماتیک در هشت گله مرغان محلی در استان جیانگشی، توانستند ۷۱ سویه از ۵۶۰ نمونه جدا کرده و توالی‌های env آنها را با موفقیت توالی‌یابی کنند. آنها نشان دادند که همه این جدایه‌های جدید متعلق به زیرگروه J هستند، اما ویژگی‌های مولکولی متفاوتی داشتند و با سویه‌هایی که اخیراً در جوجه‌های گوشتی با ویژگی سفید ظاهر شده بودند بسیار متفاوت بودند (۳۷). وو و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۲ در چین مطالعه‌ای را جهت توصیف ژنوم و تجزیه و تحلیل ضایعات و هیستوپاتولوژی سویه ALV-J به نام HB2020 که از مرغان تخمگذار استان هوبی، چین جدا شده بود، انجام دادند. تجزیه و تحلیل توالی ژنوم پروویروسی تمام طول ALV-J HB2020 نشان داد که این یک سویه نو ترکیب ev-1 و HPRS-103 در ژن gag در مقایسه با نمونه اولیه ALV-J HPRS-103 بوده است و در ناحیه ۳-۱ ترجمه نشده (UTR^۳) توالی نوکلئوتیدی، حذف ۲۰۵ جفت باز (bp) یافت شد که از این تعداد ۱۷۵ جفت در ناحیه گذرنده اضافی (rTM) شناسایی شد. علاوه بر این، ژن گلیکوپروتئین سطحی gp85 دارای پنج جهش بود، در حالی که ژن پروتئین گذرنده gp37 نسبتاً حفظ شده بود. آزمایش‌های حیوانی که بعداً روی این سویه انجام شد نشان داد که HB2020 می‌تواند ضایعات نوپلاستیک مختلفی در جوجه‌ها از جمله هایپرتروفی کبد همراه با همانژیوم و اسپلنومگالی همراه با ندولهای سفید رنگ را ایجاد کند که تا حدودی با نتایج این مطالعه هم‌خوانی داشت. علاوه بر این، با افزایش زمان در معرض قرار گیری، تعداد سلول‌های توموری شبه میلوستیتی در اسمیر خون جوجه‌های آلوده به تدریج افزایش یافت. این نتایج نشان داد که HB2020 در نو ترکیبی با زیرگروه ALV E (ALV-E) و ALV-J می‌تواند

عملکرد قلبی ریوی هوبره‌ها افزایش پیدا کرده است. همچنین تا آنجایی که مرور اسناد و مدارک علمی مرتبط به ما نشان داد، این اولین گزارش از استئوسارکوم در هوبره با تظاهرات پلی استئوتیک غیرمعمول و مرتبط با عفونت ویروس لکوز پرندگان است. تظاهرات پلی استئوتیک استئوسارکوم قبلاً در یک دلجچه معمولی وحشی (Falco tinnunculus) گزارش شده بود که طی آن مفاصل پای چپ و راست (زانو و مچ) تحت تأثیر قرار داده بود، در این گزارش هیچ اشاره‌ای به عفونت ویروسی نشده بود (۴۷). وقوع نئوپلاسم‌های مختلف در پرندگان شکاری در بریتانیا در سال ۲۰۰۰ بررسی شده است و طی این بررسی وقوع استئوسارکوم را در یک پرنده شکاری که هیبریدی از بالابان ((Falco cherrug (saker falcon) و شنقار ((gyrfalcon (Falco rusticolus) بوده است و همچنین در یک سارگپه معمولی ((common buzzard (Buteo buteo) گزارش کرده‌اند (۴۸). فوردهام و همکاران در سال ۲۰۱۰ استئوسارکوم داخل چشمی را در کاکادو چتری (white cockatoo (Cacatua alba) گزارش شده است (۴۹). لامب و همکاران در سال ۲۰۱۴ استئوسارکوم تیپوتارس با متاستاز ریوی را در قمری گردن‌حلقه‌ای ((Streptopelia ring-necked dove (risoria) گزارش نمودند (۵۰). اسلاداکویچ و همکاران وقوع استئوسارکوم داخل جمجمه‌ای همراه با فشردگی بافت مغز را در یک جغد نیرومند (powerful owl (Ninox strenua) گزارش نمودند (۵۱). دوارته بن ونوتو و همکاران وقوع استئوسارکوم خودبخودی اولیه تیپوتارسال راست همراه با متاستاز ریوی را در کبوتر دریایی مدیترانه‌ای Scopolia's shearwater (Calonectris diomedea) گزارش نمودند (۵۲). همچنین بوچر و همکاران در سال ۲۰۲۲ استئوسارکوم تلانژکتاتیک تیپوتارس در پرنده کیوی قهوه‌ای جزیره شمالی (Apteryx mantelli) را گزارش کردند که طی آن استخوان تیپوتارس

سویه جداسازی شده رخ داد و لذا توانایی اتصال این سویه جهش یافته ویروس لکوز پرندگان به گیرنده‌های سلول میزبان همچنین میزان حساسیت و بیماری‌زایی را افزایش داد. با این حال، مطالعات بیشتری در آینده باید تأثیر این جهش‌ها را بر اتصال ویروس به میزبان ارزیابی کند. در مقایسه با سویه شاهد HPRS103، تلفیح ویروس به پرندگان نشان داد که سویه جداسازی شده باعث ویرمی و شدیدتر شدن ویروسی شدیدتر می‌شود. علاوه بر این، سویه جدا سازی شده میزان تغییرات وزن نسبی طحال را احتمالاً به دلیل اسپلنومگالی شدیدتر ناشی از عفونت افزایش داد (۴۳). همچنین سویه جداسازی شده به‌طور قابل‌توجهی در تمام فواصل زمانی این مطالعه، میزان تکثیر ویروس را در طحال و تیموس افزایش داد. علاوه بر این، سویه جدا سازی شده لود ویروسی را در اندام‌های ایمنی در مقایسه با HPRS103 افزایش داد. نتایج یک مطالعه قبلی نشان داده است که ALV-J تمایل زیادی به بافت‌های لنفاوی (عمدتاً تیموس، بورس فابریسیوس و بافت طحال) داشته و این قسمت‌ها را هدف قرار می‌دهد (۴۳). تمایل خاص سویه جدا سازی شده به ارگان‌های ایمنی ممکن است میل به مورد هدف قرارگیری این ارگانها توسط سویه جداسازی شده را افزایش داده باشد. علاوه بر این، سویه جداسازی شده باعث آسیب قلبی ریوی جدی تری نسبت به HPRS103 شد. مطالعات قبلی نشان داده بود که ALV-J می‌تواند به ریه و قلب حمله کند (۴۴)؛ بنابراین اینگونه به نظر می‌رسد که محل اجرای نقش کلیدی و تنظیمی پروتئین p53 در ریه باشد (۴۵). هوبره‌ها به دلیل ویژگی‌های خاص آناتومیکی و بدنی، عملکرد قلبی ریوی قوی تری را نسبت به پرندگان مشابه به خود دارند (۴۶)؛ بنابراین، سویه جداسازی شده ممکن است در ایران و نیز در بدن پرندگان دچار یک جهش تطبیقی شده باشد که در نتیجه این جهش، توانایی ویروس برای آسیب رساندن به

استئوپتروز اولیه حمایت می‌کند. هوبره یک گونه در معرض خطر در نظر گرفته می‌شود، بنابراین عفونت با ویروس لکوز پرندگان ممکن است بر برنامه‌های حفاظتی تأثیر بگذارد، زیرا بسیاری از پرندگان ممکن است بدون علامت و با احتمال انتقال عمودی باشند. در برخی شرایط این ویروس ممکن است مسئول شیوع نئوپلاسم‌هایی باشد که تکامل‌کننده داشته باشند (۵۸). در نهایت، این گزارش اهمیت ویروس لکوز پرندگان را در ارتباط با یک نئوپلاسم بدخیم و متاستاتیک و نیاز به نظارت فعال و دائمی، به ویژه در گونه‌های وحشی در معرض تهدید و اسیر را، برجسته می‌کند.

فهرست منابع

1. Prater S, McKeon B. Osteosarcoma. 2019.
2. Poon AC, Matsuyama A, Mutsaers AJ. Recent and current clinical trials in canine appendicular osteosarcoma. *The Canadian Veterinary Journal*. 2020;61(3):301.
3. Dillberger J, Citino S, Altman N. Four cases of neoplasia in captive wild birds. *Avian diseases*. 1987;206-13.
4. Jarvis S, Koumadoraki E, Madouros N, Sharif S, Saleem A, Khan S. Non-rodent animal models of osteosarcoma: a review. *Cancer Treatment and Research Communications*. 2021;27:100307.
5. Nakamura H, Konnai S, Okagawa T, Maekawa N, Sajiki Y, Watari K, et al. Combined immune checkpoint blockade enhances antiviral immunity against bovine leukemia virus. *Journal of virology*. 2023;97(1):e01430-22.
6. Ishihara S. Detection of long terminal repeat loci derived from endogenous retrovirus in junglefowl using whole-genome sequencing. *Scientific Reports*. 2023;13(1):7380.
7. Berchieri Jr A, Murphy C, Marston K, Barrow P. Observations on the persistence and vertical transmission of Salmonella

پروگزیمال چپ دچار لیز استخوانی همراه با ایجاد فضاهای متعدد پر از خون شده بود که توسط سپتوم‌های فیبری ضخیم و سلول‌های مزانشیمی نئوپلاستیک از هم جدا شده بودند و استئوئید تولید می‌کردند هیچ متاستازی در کالبد گشایی این پرنده مشاهده نشد (۵۳). در حیوانات اهلی، استئوسارکوم معمولاً منجر به متاستاز می‌شود که اغلب بر ریه‌ها، کلیه‌ها و کبد تأثیر می‌گذارد (۵۴). عفونت ویروس لکوز پرندگان معمولاً با ایجاد انواع مختلفی از نئوپلاسم‌های مزانشیمی، از جمله میکسوسارکوم، همانژیوسارکوم، لیومیوسارکوم، نوروفیبروم و هماژیوم همراه است (۵۵). نکته مهم این است که استئوسارکوم قبلاً در میش مرغ سانان (Otidiformes) و هوبره ایان آلوده به ویروس لکوز گزارش نشده است، بنابراین این مطالعه دانش موجود در مورد محدوده میزبان و پتانسیل پاتوژنز این ویروس را افزایش می‌دهد. از سوی دیگر، استئوپتروز یک ضایعه پرولیفراتیو شایع در جوجه‌های آلوده به ویروس لکوز است و معمولاً دارای فرم توزیع چند کانونه است و در هر دو اندام حرکتی درگیری ایجاد می‌شود (۵۶). جالب توجه است که الگوی رشد بیش از حد ماتریکس استخوانی در استئوپتروز از سمت قشر استخوان است که به صورت داخلی گسترش می‌یابد و تمام فضای مدولار یا پنوماتیک را پر می‌کند و از خارج منجر به فشردگی شدن اعصاب و بافت عضلانی مجاور می‌شود. این همان الگوی رشدی بود که در این مطالعه مشاهده شد که در طی آن سلول‌های پلئومورفیک، با ویژگی‌های بدخیمی شدید شناسایی شدند که متاستاز کلیوی و کبدی را نیز ایجاد کرده بودند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که ویروس لکوز پرندگان قادر به تغییر و تمایز و فعالیت پرولیفراتیو استئوبلاست‌ها است (۵۷) و با در نظر گرفتن پتانسیل انکوژنیک بسیار بالای این ویروس، این خصوصیات مشاهده شده از مفهوم تکثیر نئوپلاستیک بدخیم رتروویروسی ناشی از یک ضایعه

- enterica serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. *Avian pathology*. 2001;30(3):221-31.
8. Vivar C, Peterson B, Pinto A, Janke E, van Praag H. Running throughout middle-age keeps old adult-born neurons wired. *Eneuro*. 2023;10.(^o)
 9. Zhang Q, Xie T, Mo G, Zhang Z, Lin L, Zhang X. ACSL1 inhibits ALV-J replication by IFN-I signaling and PI3K/Akt pathway. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:774323.
 10. Xie T, Feng M, Zhang X, Li X, Mo G, Shi M, et al. Chicken CH25H inhibits ALV-J replication by promoting cellular autophagy. *Frontiers in Immunology*. 2023;14:1093289.
 11. Sun Y, Lu Q, Zhang J, Li X, Zhao J, Fan W, et al. Co-infection with avian hepatitis E virus and avian leukosis virus subgroup J as the cause of an outbreak of hepatitis and liver hemorrhagic syndromes in a brown layer chicken flock in China. *Poultry science*. 2020;99(3):1287-96.
 12. Payne L, Brown S, Bumstead N, Howes K, Frazier JA, Thouless ME. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. *Journal of general virology*. 1991;72(4):801-7.
 13. Wang X, Zhou D, Wang G, Huang L, Zheng Q, Li C, et al. A novel multi-variant epitope ensemble vaccine against avian leukosis virus subgroup J. *Vaccine*. 2017;35(48):6685-90.
 14. Xu Q, Ma X, Wang F, Li H, Xiao Y, Zhao X. Design and construction of a chimeric multi-epitope gene as an epitope-vaccine strategy against ALV-J. *Protein Expression and Purification*. 2015;106:18-24.
 15. Liu P, Li L, Jiang Z, Yu Y, Chen X, Xiang Y, et al. Molecular characteristics of subgroup J avian leukosis virus isolated from yellow breeder chickens in Guangdong, China, during 2016–2019. *Infection, Genetics and Evolution*. 2021;89:104721.
 16. Qiao D, He Q, Cheng X, Yao Y, Nair V, Shao H, et al. Regulation of avian leukosis virus subgroup J replication by Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Viruses*. 2021;13(10):1968.
 17. Su Q, Li Y, Cui Z, Chang S, Zhao P. The emerging novel avian leukosis virus with mutations in the pol gene shows competitive replication advantages both in vivo and in vitro. *Emerging Microbes & Infections*. 2018;7(1):1-11.
 18. Gao X, Li Q, Fang L, Song H, Cui Z, Meng F, et al. The follicle promotes the evolution of variants of avian leukosis virus subgroup J in vertical transmission. *Biochemical and biophysical research communications*. 2020;521(4):1089-94.
 19. Wang Q, Gao Y, Wang Y, Qin L, Qi X, Qu Y, et al. A 205-nucleotide deletion in the 3' untranslated region of avian leukosis virus subgroup J, currently emergent in China, contributes to its pathogenicity. *Journal of virology*. 2012;86(23):12849-60.
 20. Wu L, Li Y, Chen X, Yang Y, Fang C, Gu Y, et al. Isolation and characterization of avian leukosis virus subgroup J associated with hemangioma and myelocytoma in layer chickens in China. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022;9:970818.
 21. Silva R, Fadly A, Hunt H. Hypervariability in the envelope genes of subgroup J avian leukosis viruses obtained from different farms in the United States. *Virology*. 2000;272(1):106-11.
 22. Li T, Yao X, Li C, Zhang J, Xie Q, Wang W, et al. Gp37 regulates the pathogenesis of avian leukosis virus subgroup J via its C terminus. *Journal of Virology*. 2020;94(11):e02180-19.
 23. Seddon PJ, van Heezik Y. Seasonal changes in Houbara Bustard *Chlamydotis undulata macqueenii* numbers in Harrat al Harrah, Saudi Arabia: implications for managing a remnant population. *Biological Conservation*. 1996;75(2):139-46.
 24. Aghanajafizadeh S, Hemami MR, Naderi G, Heydari F. Estimation of Houbara Bustard,

- Chlamydotis macqueenii*, population density in the central Iranian steppes: (Aves: Otidae). *Zoology in the Middle East*. 2012;56(1):3-8.
25. Burnside RJ, Collar NJ, Dolman PM. Dataset on the numbers and proportion of mortality attributable to hunting, trapping, and powerlines in wild and captive-bred migratory Asian houbara *Chlamydotis macqueenii*. *Data in brief*. 2018;21:1848-52.
 26. Decaro N, Lorusso A. Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Veterinary microbiology*. 2020;244:108693.
 27. Blume GR, Cardoso SP, Oliveira M, Matioli M, Gómez S, Reis Junior JL, et al. Visceral Marek's disease in white-peafowl (*Pavo cristatus*). *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*. 2016;68:1602-8.
 28. Pang Y, Zhou D, Xue J, Zhou J, Zhang Y, Zheng G, et al. Interplay between CTHRC1 and the SU protein of avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) facilitates viral replication. *Virus research*. 2019;264:32-9.
 29. He S, Zheng G, Zhou D, Huang L, Dong J, Cheng Z. High-frequency and activation of CD4+ CD25+ T cells maintain persistent immunotolerance induced by congenital ALV-J infection. *Veterinary Research*. 2021;52:1-15.
 30. Swanstrom R, Graham WD, Zhou S. Sequencing the biology of entry: the retroviral env gene. *Viruses, Genes, and Cancer*. 2017:65-82.
 31. Rabier R, Lesobre L, Robert A. Reproductive performance in houbara bustard is affected by the combined effects of age, inbreeding and number of generations in captivity. *Scientific Reports*. 2021;11(1):7813.
 32. Carreira JT, Lesobre L, Boullenger S, Chalah T, Lacroix F, Hingrat Y. Assisted Reproduction Techniques to Improve Reproduction in a Non-Model Species: The Case of the Arabian Bustard (*Ardeotis arabs*) Conservation Breeding Program. *Animals*. 2022;12(7):851.
 33. Lu Z, Li S, Li H, Wang Z, Meng D, Liu J. The gut microbiota of wild wintering great bustard (*Otis tarda dybowskii*): survey data from two consecutive years. *PeerJ*. 2021;9:e12562.
 34. Muneer A, Kumar S, Aqib AI, Khan SR, Shah SQA, Zaheer I, et al. Evaluation of Sodium Alginate Stabilized Nanoparticles and Antibiotics against Drug Resistant *Escherichia coli* Isolated from Gut of Houbara Bustard Bird. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022;2022.
 35. Henriques AM, Fagulha T, Duarte M, Ramos F, Barros SC, Luís T, et al. Avian poxvirus infection in a flamingo (*Phoenicopterus ruber*) of the Lisbon Zoo. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2016:161-74.
 36. Burnside RJ, Buchan C, Salliss D, Collar NJ, Dolman PM. Releases of Asian houbara must respect genetic and geographic origin to preserve inherited migration behaviour: Evidence from a translocation experiment. *Royal Society Open Science*. 2020;7(3):200250.
 37. Li H, Tan M, Zhang F, Ji H, Zeng Y, Yang Q, et al. Diversity of Avian leukosis virus subgroup J in local chickens, Jiangxi, China. *Scientific reports*. 2021;11(1):4797.
 38. Xu M, Mu X, Qian K, Shao H, Yao Y, Nair V, et al. Novel mutation of avian leukosis virus subgroup J from Tibetan chickens. *Poultry Science*. 2021;100(3):100931.
 39. Munguia A, Federspiel MJ. Avian sarcoma and leukosis virus envelope glycoproteins evolve to broaden receptor usage under pressure from entry competitors. *Viruses*. 2019;11(6):519.
 40. Xu M, Qian K, Shao H, Yao Y, Nair V, Ye J, et al. Glycosylation of ALV-J envelope protein at sites 17 and 193 is pivotal in the virus infection. *Journal of Virology*. 2022;96(4):e01549-21.
 41. Chen J, Li J, Li L, Liu P, Xiang Y, Cao W. Single amino acids G196 and R198 in hr1

- of subgroup K avian leukosis virus glycoprotein are critical for Tva receptor binding. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:596586.
42. Li J, Liu L, Niu X, Li J, Kang Z, Han C, et al. Research Note: A novel recombinant subgroup E isolate of the avian leukosis virus with a subgroup B-like Gp85 region in China. *Poultry Science*. 2021;100(7):101137.
43. Xu M, Hang F, Qian K, Shao H, Ye J, Qin A. Chicken hepatomegaly and splenomegaly associated with novel subgroup J avian leukosis virus infection. *BMC Veterinary Research*. 2022;18(1):1-6.
44. Dai M, Feng M, Liu D, Cao W, Liao M. Development and application of SYBR Green I real-time PCR assay for the separate detection of subgroup J Avian leukosis virus and multiplex detection of avian leukosis virus subgroups A and B. *Virology journal*. 2015;12:1-10.
45. Zhang H, Zhang H, Cao S, Sui C, Song Y, Zhao Y, et al. Knockout of p53 leads to a significant increase in ALV-J replication. *Poultry Science*. 2021;100(10):101374.
46. Cabodevilla X, Mougeot F, Bota G, Mañosa S, Cuscó F, Martínez-García J, et al. Metabarcoding insights into the diet and trophic diversity of six declining farmland birds. *Scientific Reports*. 2021;11(1):21131.
47. Bossa LMDL, Mennonna G, Meomartino L, Paciello O, Ciccarelli F, De Biase D, et al. Polyostotic chondroblastic osteosarcoma in a kestrel (*Falco tinnunculus*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 2015;29(4):336-9.
48. Forbes NA, Cooper JE, Higgins RJ. Neoplasms of birds of prey. *Raptor Biomedicine III Lake Worth, FL: Zoological Education Network*. 2000:127-45.
49. Fordham M, Rosenthal K, Durham A, Duda L, Komáromy AM. Case report: intraocular osteosarcoma in an umbrella cockatoo (*Cacatua alba*). *Veterinary ophthalmology*. 2010;13:103-8.
50. Lamb S, Reavill D, Wojcieszyn J, Sitas N. Osteosarcoma of the tibiotarsus with possible pulmonary metastasis in a ring-necked dove (*Streptopelia risoria*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 2014;28(1):50-6.
51. Sladakovic I, Sangster CR, Allan GS, Portas TJ, Howlett CR, Blas-Machado U. Calvarial osteosarcoma with cerebral compression in a free-ranging powerful owl (*Ninox strenua*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2017;48(1):208-12.
52. Duarte-Benvenuto A, dos Santos Costa PC, Jerdy H, de Carvalho ECQ, Catão-Dias JL, Díaz-Delgado J. Spontaneous Primary Right Tibiotarsal Osteosarcoma with Pulmonary Metastasis in a Free-Ranging Cory's Shearwater (*Calonectris diomedea*). *Journal of wildlife diseases*. 2020;56(1):243-6.
53. Butcher RG, Jolly M, Dittmer KE, Hunter S. Telangiectatic Osteosarcoma of the Tibiotarsus in a North Island Brown Kiwi (*Apteryx mantelli*). *The Journal of Wildlife Diseases*. 2022;58(4):947-50.
54. Chea C, Haing S, Miyauchi M, Shrestha M, Imanaka H, Takata T. Molecular mechanisms underlying the inhibitory effects of bovine lactoferrin on osteosarcoma. *Biochemical and biophysical research communications*. 2019;508(3):946-52.
55. Freick M, Schreiter R, Weber J, Vahlenkamp TW, Heenemann K. Avian leukosis virus (ALV) is highly prevalent in fancy-chicken flocks in Saxony. *Archives of virology*. 2022;167(4):1169-74.
56. Maurizi A. Experimental therapies for osteopetrosis. *Bone*. 2022;165:116567.
57. Barbosa T, Ramirez M, Hafner S, Cheng S, Zavala G. Forensic investigation of a 1986 outbreak of osteopetrosis in commercial brown layers reveals a novel avian leukosis virus-related genome. *Avian diseases*. 2010;54(3):981-9.
58. Cui N, Su S, Sun P, Zhang Y, Han N, Cui Z. Isolation and pathogenic analysis of virulent

Marek's disease virus field strain in China.
Poultry science. 2016;95(7):1521-8.