

شناسایی یک سویه جدید ویروس تنفسی در ایگوانای سبز (ایگوانا)

پیمان محمدزاده^{۱*}، سجاد محمدی^۲

چکیده

اخیراً نیدوویروس‌ها به‌عنوان عامل احتمالی بیماری‌های تنفسی شدید در خزندگان و بخصوص مارهای پیتون از نقاط مختلفی از جهان توصیف شده‌اند. هدف از این مطالعه، جداسازی عامل بیماری‌زا همراه با تعیین دقیق خصوصیات و نیز بررسی یافته‌های هیستوپاتولوژی در یک ایگوانای ماده می‌باشد. در طی معاینات پس از مرگ، ضایعات پیوگرانولوماتوز و فیبرونکروتیک در سیستم‌هایی غیر از دستگاه تنفس این ایگوانا مشاهده شد و نتایج بررسی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رونویسی معکوس نیز مثبت بود لذا ارتباط بین مشاهده این ضایعات گسترده با نتایج کالبدگشایی حاصل از مطالعه موارد ابتلا به سرپنتوویروس‌های قبلی و نیز میزان و نوع تغییرات در ژنوم سرپنتوویروس شناسایی شده با سرپنتوویروس قبلی بررسی شد. تلقیح کشت سلولی و سپس RT-PCR برای جمع‌آوری و به دست آوردن ایزوله ویروسی استفاده شد. در ادامه ایمونوهیستوشیمی انجام شد. رنگ‌آمیزی برای نوکلئوپروتئین سرپنتوویروس نشان داد که این ویروس نه تنها طیف وسیعی از اپیتلیوم (اپیتلیوم تنفسی و گوارشی، سلول‌های کبدی، لوله‌های ادراری، مجاری پانکراس و غیره)، بلکه مونوسیت‌های داخل عروقی، ماکروفاژهای داخل ضایعه و سلول‌های اندوتلیال را نیز آلوده می‌کند. با توالی یابی نسل بعدی، ژنوم کامل برای این گونه سرپنتوویروس جدید به دست آمد. تجزیه و تحلیل ژنوم ویروسی بازایی شده از این بیماری تنفسی و سیستمیک مرتبط با عفونت سرپنتوویروس، ارتباط توالی با فنوتیپ سایر سویه‌ها را نشان نداد. نتایج نشان داد که این سرپنتوویروس تروپسم سلولی و بافتی گسترده‌ای دارد و سیر عفونت‌زایی توسط آن می‌تواند متفاوت باشد و در نتیجه گسترش سیستمیک ویروس در بدن ضایعات در طیف گسترده‌ای از بافت‌ها و سیستم‌های مختلف بدن ایجاد می‌کند.

واژگان کلیدی: نیدو ویروس، کشت سلولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رونویسی معکوس، توالی یابی نسل بعدی، آسیب‌شناسی، ایگوانا

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱/۲۰

مقدمه

راسته نیدوویرال‌ها (Nidovirales) یا نیدوویروس‌ها (Nidoviruses) راسته بزرگی از ویروس‌های آران‌ای با سوی مثبت (positive-strand RNA viruses) و تک‌رشته‌ای پوشش‌دار هستند (۱). نیدوویروس‌ها به‌عنوان آلوده‌کننده طیف وسیعی از میزبان‌های متنوع شامل مهره‌داران و بی‌مهرگان شناخته شده‌اند و تعدادی از آنها باعث ایجاد بیماری‌های جدی در انسان و حیوانات شده‌اند. در انسان، معروفترین اعضا این راسته شامل نیدوویروس‌های متعلق به خانواده کرونا ویریده (Coronaviridae) هستند و ابتلا به آنها می‌تواند منجر به طیف گسترده‌ای از تظاهرات از عفونت‌های بدون علامت تا عوارضی با میزان مرگ‌ومیر قابل توجه مرتبط با سندرم حاد تنفسی کرونا (SARS-CoV) و سندرم تنفسی خاورمیانه (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 1 MERS-CoV: Middle East) و سندرم حاد تنفسی شدید کرونا ۲ (Severe respiratory syndrome-related coronavirus) شوند. این خانواده همچنین شامل ویروس مسئول همه‌گیری جهانی COVID 19، سندرم حاد تنفسی شدید کرونا ۲ (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) است. به دنبال ظهور این ویروس‌ها در انسان از منابع حیوانی، بخصوص بدنبال پاندمی کووید-۱۹، علاقه مجدد به مطالعه نیدوویروس‌های حیوانی از جمله درک خطر انتقال بین گونه‌ای (Cross-species transmission (CST), or interspecies transmission) از مخازن حیات وحش وجود دارد. ویروس‌های جدید که از مخازن حیات وحش، به‌ویژه

۱- گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
peymanpathologist@iausdj.ac.ir

۲- دانشجوی دوره دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج ایران

مرگ و میر بالا، نیدوویروس‌ها در خزندگان نیز مورد توجه هستند. بطور کلی با افزایش فوکوس مطالعات در این زمینه تعداد ویروس‌ها در راسته نیدوویرالها با معرفی نسل بعدی توالی یابی (Next Generation Sequencing (NGS)) که در آن امکان شناسایی کلیه جهش‌های نقطه‌ای، حذف و مضاعف شدگی‌ها و بازآرایی‌های کروموزومی امکانپذیر می‌شود و همچنین شروع مطالعات متازنومیک (Metagenomics Studies) که عبارتست از مطالعه ساختار و عملکرد و نیز تجزیه و تحلیل کل توالی‌های نوکلئوتیدی جدا شده از میکروب‌ها در یک نمونه محیطی، به سرعت در حال گسترش است. در حقیقت استفاده از این قبیل فناوری‌ها بخصوص در زمانی که روش‌های تشخیصی کلاسیک ناموفق باشند، یک رویکرد بی طرفانه برای تشخیص پاتوژنها را ارائه می‌دهد؛ و درحقیقت با استفاده از همین تکنیک‌ها اولین بار نیدوویروس‌ها در خزندگان کشف و متعاقباً در سال ۲۰۱۴ گزارش شد (۴). یکی از مهمترین بیماریها در بین جمعیت بال پیتون‌ها (پیتون توپی) (Ball Python (Python regius)) ابتلا به بیماریهای تنفسی است که از سال‌ها قبل وجود داشته است بطوری که دامپزشکان در اواخر دهه ۱۹۹۰ سندرم تنفسی با علت ناشناخته را گزارش کرده اند (۵). در ادامه مطالعات متعددی بر روی این سندرم انجام گرفت و متخصصان با استفاده تکنیک نسل بعدی توالی یابی و به دنبال حذف پاتوژن‌های شناخته شده، توانستند با شناسایی توالی‌های جدید ویروسی در این مار، این ویروس را به‌عنوان عامل این سندرم تنفسی شناسایی و ابتلا به نیدوویروس را برای اولین بار در این مار گزارش کنند (۴). این ویروسها همچنین در گونه‌هایی از مارمولک‌ها و لاک پشت‌ها جدا سازی شده اند (۶). بطوری که در دهه ۱۹۹۰ یک سندرم تنفسی در سقنقور دم‌کوتاه زبان آبی وحشی استرالیایی (Tiliqua rugosa, also called shingleback lizard or bobtail lizard) گزارش شد که

خفاش‌ها منشأ می‌گیرند، همچنین باعث مرگ و میر و عوارض قابل‌توجهی در جمعیت‌های جانوری، از جمله سندرم حاد اسهال خوکی (Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV)) شده‌اند. این ویروس در مرگ نزدیک به ۲۵۰۰۰ خوک دخیل بوده است. سایر نیدوویروس‌ها در حیوانات مرتبط با خسارات اقتصادی قابل توجه عبارتند از عفونت با ویروس آرتریت اسبی (Equine viral arteritis (EVA))، ویروس سندرم تناسلی و تنفسی خوک (Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV))، ویروس اسهال اپیدمی خوک (Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)) و ویروس بیماری بورس عفونی (Infectious Bursal Disease (IBDV)) (۲). اگرچه بیشتر نیدوویروس‌های شناخته شده با میزبان‌های خشکی زی (Terrestrial Hosts) مرتبط هستند، اما همچنین در ماهی‌ها (ویروس ماهی سیم نما (white bream virus (first isolated from white bream (Blicca bjoerkna) in Germany))، ویروس ماهی مینوی سرگنده (Fathead Minnow nidovirus (first isolated from Fathead minnow (Pimephales promelas), also known as fathead or tuffy))، بافینی ویروس آزاد ماهی جویبار (Chinook Salmon Bafinivirus (CSBV) (first isolated from The Chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha) Yellow head virus))، ویروس بیماری سر زرد (Yellow head virus (YHV) infects the black tiger shrimp (Penaeus Gill-associated monodon))، ویروس مرتبط با آبشش (monodon))، ویروس (GAV))، و چندین گونه آبی دیگر هم مانند خرگوش‌های دریایی (The clade Anaspidea, also called sea hares (Aplysia species and related genera) Planaria (free-living))، کرم‌های مسطح آزاد آب شیرین (freshwater flatworm))، خرچنگ‌ها (Crabs (Brachyura)) و پستانداران دریایی (Marine mammal)) بیماری‌های مهمی ایجاد می‌کنند (۳). به دلیل اهمیت روزافزون و ارتباطات اخیر این راسته با پاندمی‌های تنفسی همراه با عوارض و

۱,۵ میلی لیتری اپندورف (میکروسانتریفیوژ) (Eppendorf safe-lock Microcentrifuge Tubes) و لوله های مخروطی ۲ میلی لیتری با درپوش پیچی قرار داده شدند و بلافاصله جهت بررسی به آزمایشگاه میکروبیولوژی ارسال شدند. سپس ابتدا تمامی نمونه ها بر روی محیط کشت آگار خون دار حاوی ۵ درصد خون گوسفند (Thermo Scientific™ Blood Agar (TSA with Sheep Blood) Medium Thermo Scientific™) محیط کشت مک کانکی آگار (Thermo Scientific™ MacConkey-Agar (dehydrated)) و محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار (Thermo Scientific™ Eosin Methylene Blue Agar (Modified) (Levine) (Dehydrated)) داده شدند. در ادامه تمام نمونه ها به صورت هوازی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. برای تشخیص گونه های سالمونلا نمونه های اخذ شده از کلواک علاوه بر این دو محیط کشت در محیط کشت پیتون واتر (Thermo Fisher Scientific - Gibco™ Peptones (Buffered Peptone Water (ISO) (Dehydrated))) نیز در طول یک شبانه روز و در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. سپس به طور انتخابی در محیط کشت نیمه جامد اصلاح شده ام اس ار وی (Thermo Scientific™ MSR V medium base (Modified semisolid Rappaport ۴۱,۵ (dehydrated) (Vassiliadis medium)) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت غنی سازی شدند. در ادامه کلنی های انتخاب شده روی گزیلوز لیزین دزوکسی کولات (XLD) آگار (Thermo Scientific XLD-Agar (dehydrated)) و برلیانت گرین آگار (BPLS (Thermo Scientific™ Brilliant green phenol red lactose sucrose agar (BPLS agar) (dehydrated))) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت زیر کشت قرار گرفتند. شناسایی نهایی تمامی باکتری های جدا شده توسط دستگاه اسپکترومتر جرمی TOF مدل MALDI-8020 (MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass

بسیار شبیه به سندرم گزارش شده در بال پیتونها بود. در سال ۲۰۱۶، اولین نیدو ویروس در مارمولک در همین گونه گزارش شد (۷). در سال ۲۰۲۰ نیز یک نیدو ویروس جدید مرتبط با مارمولک ها به دنبال مرگ و میرهای مرتبط با بیماری های تنفسی در آفتاب پرست پرده دار (آفتاب پرست یمنی) (Veiled Chameleon (Chamaeleo calyptatus)) شناسایی شد (۸). ضایعات مشاهده شده در این خزندگان از نظر ماکروسکوپی شامل موارد متنوعی همچون وضعیت بدنی نامناسب و اتروفیک، پلک های متورم دو طرفه و وجود کانون های برنزه روی پوست بخش شکمی ران و جراحات میکروسکوپی نیز بیشتر شامل التهاب و نکروز اطراف کره چشم، طحال و کلیه ها بود. درک خطری که این بیماری های عفونی ایجاد می کنند ممکن است برای جلوگیری از کاهش مداوم جمعیت گونه ها حیاتی باشد. در نتیجه این حوزه تحقیقاتی نسبتاً جدید فرصت های منحصر به فردی را برای کشف شکاف های عمده در دانش ارائه می دهد.

مواد و روش کار

بدنبال ارجاع یک ایگوانای سبز با علایم مشخص توضیح داده شده در بخش نتایج معاینات لازم انجام (نگاره ۶) و درمان دارویی شروع شد در عرض یک هفته علایم به یک درگیری تنفسی بصورت پنومونی شدید (Severe acute pneumonia) و زجر تنفسی حاد (Acute respiratory distress syndrome (ARDS)) تبدیل شد و باعث مرگ ناگهانی حیوان شد. لذا بلافاصله اقدام به کالبد گشایی شد. در مرحله اول نمونه هایی از قسمت های مختلف بدن شامل سواب هایی از محوطه دهانی (Oral cavity)، کوان (قیفک) بینی (Choanae) و کلواک (Cloaca) با استفاده از سواب های پنبه ای با نوکی از جنس ابریشم مصنوعی (Strile Swab Manufactured by Copan Italia S.p.A., Italy) جمع آوری شد سپس سواب های خشک در یک لوله

میلی لیتری قرار داده شدند و سپس به مدت نیم ساعت در دمای اتاق با استفاده از شیکر هم زده شدند تا مجدداً در محیط کشت معلق شوند. در ادامه جهت آنالیز متازنومیکس و مطالعه مواد ژنتیکی مستقیماً به دست آمده از نمونه، ۲۵۰ میکرولیتر از بافت ریه همگن شده با ۷۵۰ میکرولیتر از معرف گوانیدینیوم تیوسیانات-فنل ترایزول (Invitrogen™ TRIzol™ Reagenz)، به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شد تا محتویات لیز شده و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند در طول استفاده از ترایزول هر چند دقیقه یکبار (هر بار به مدت ۱۰ ثانیه) ورتکس انجام می‌شد. این مرحله بایستی به سرعت و همراه با دقت عمل بالا انجام شود تا RNA در دمای محیط تخریب نشود. سپس و در گام سوم به منظور تخلیص نمونه از کلروفرم و ایزوپروپانول استفاده شد. پس از اضافه کردن کلروفرم، مطلقاً از ورتکس استفاده نشد و فقط نمونه‌ها شیک شد. به این ترتیب که کلروفرم سرد به میکروتیوب اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان داده شد. سپس به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه میکروتیوب در دمای اتاق قرار گرفت و سپس میکروتیوب حاوی نمونه در ۱۴۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در انتهای این مرحله RNA از فاز آبی با استفاده از ایزوپروپانول رسوب داده شد. در ادامه فاز آبی رویی به میکروتیوب جدید RNase free سرد منتقل شد و بر روی آن به میزان هم حجم ایزوپروپانول سرد اضافه شد. سپس چند بار میکروتیوب اینورت شد و به مدت ۵ ساعت در فریزر ۲۰ - درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس میکروتیوب به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در مرحله چهارم فرآیند شستشو انجام شد. در این مرحله سوپرناتانت تخلیه شده و بر روی رسوب ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد. چند مرتبه پیتاژ انجام شد و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با

(Spectrometry) انجام شد (MALDI-TOF MS (MALDI (Biotyper, Bruker Daltonics, Germany). از آنجایی که آزمایش‌های معمول باکتریولوژیک و ویروس‌شناسی نتوانستند عامل اصلی بیماری را شناسایی کنند، تصمیم به جداسازی ویروس گرفته شد. برای این منظور ابتدا سوسپانسیون‌های تهیه شده از بافت‌های ریه، کلیه و مغز ایگوانا در محیطی استریل و عاری از باکتری تهیه و به محیط کشت سلولی تجاری سلول‌های قلب ایگوانا (IgH-2 CCL-108™ (Iguana Heart Epithelial Cells (IgH-2 Line)) American Type Culture Collection. 10801 University Boulevard Manassas, (VA 20110-2209 Manassas, Virginia, United States (تهیه شده از آمریکن تایپ کالچر کالکشن و از طریق سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی) در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد تلقیح شدند و به مدت ۱ هفته انکوبه شدند. سپس در ادامه کار و بعد از یک هفته مایع رویی (Supernatant) به کشت سلولی جدید منتقل شد و به مدت یک هفته دیگر انکوبه شد. سلول‌ها روزانه از نظر وجود اثرات سیتوپاتیک (بزرگ شدن، گرد شدن و واکنش شدن سیتوپلاسم سلول‌ها و نیز از دست دادن چسبندگی بین سلول‌ها) بررسی شدند (نگاره ۲). همزمان با استفاده از مایع رویی محیط کشت و نیز استفاده از بافت برخی از اندام‌ها PCR برای پارامیکسو ویروس، رئوویروس‌ها، رانا ویروس‌ها، آدنوویروس‌ها و رپتارنا انجام شد (۹).

استخراج RNA برای RT-PCR و NGS

به منظور استخراج RNA ابتدا قطعات کوچکی از نمونه بافتی مربوط به ریه در ۱ میلی لیتر از محلول PBS (phosphate buffered saline) PBS, pH 7.4 (Gibco™) و با استفاده از یک مهره فولادی (Steel Bead) ۵ میلی متری و در هاون چینی کوبیده شدند و سپس در دستگاه هموژنازیر (TissueLyserII (Qiagen, Hilden, Germany) همگن شدند. نمونه‌های سواب خشک گرفته شده از نای ایگوانا ابتدا در محیط کشت سلولی ۲

(library preparation kit (New England BioLabs) طبق پروتکل سازنده انجام شد. کتابخانه‌ها با استفاده از کیت مخصوص (NEBNext Library Quant kit for Illumina (New England BioLabs) کمی سازی شدند. کتابخانه‌های تلفیقی بر روی یک برنامه توالی‌سنجی (Illumina MiSeq (Illumina)) با استفاده از کیت معرف (MiSeq reagent kit (version 3; Illumina)) توالی‌یابی شدند. به منظور تأیید داده‌های NGS و تولید اطلاعات توالی‌های از دست رفته در رویکرد متازنومیک ویروسی، داده‌های مربوط به ویروس با استفاده از روش توالی‌یابی *De novo sequence assemblers* (De novo assembly) و با استفاده از نرم افزار *MetaSPAdes Online - Metagenome Sequence Assembly* (Assemble Reads with metaSPAdes - v3.15.3) جمع‌آوری شد و موارد ویروسی مشخص شد. طبقه بندی قرائت‌های ویروسی توسط نمودار کرونا (*Krona Chart (biotools:krona)*) مودایی است که فراوانی و سلسله مراتب را به طور همزمان با استفاده از یک صفحه نمایش پرکننده فضای شعاعی نمایش می‌دهد. نمودار کرونا دارای یک گرادین رنگ قرمز-سبز است که نشان‌دهنده میانگین ارزش‌های الکترونیکی BLAST در هر تاکسون است که قرمز بالاترین ارزش الکترونیکی مشاهده شده (کمترین معنی‌داری) و سبز کمترین (معنی‌دارترین) است) شناسایی و نشان داده شد.

RT-PCR

با توجه به اینکه تا قبل از این مطالعه هیچگونه گزارشی از وجود نیدوویروس در ایگواناها گزارش نشده بود لذا در این پروسه از مشخصات نیدو ویروس در یک بال پیتون استفاده شد و به منظور یافتن پرایمرهای اختصاصی برای نیدوویروس موجود در بال پیتون (LOCUS KJ541759) KJ541759 33452 bp RNA linear VRL 20-AUG-2014DEFINITION Ball python nidovirus strain 07- (53, complete genome) (5) از نرم افزار طراحی پرایمر

دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد تا RNA رسوب کند. مراحل شستشو ۳ بار تکرار شد. در انتها رسوب RNA با پیپتاژ کردن رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب DEPC (Thermo Fisher Scientific, Ambion® DEPC-treated water) حل شد تا ضریب تخریب RNA تا ۹۸٪ کاهش یابد. پس از اتمام فرآیند استخراج، جهت ارزیابی کیفی سلامت RNA استخراج شده (Integrity)، الکتروفورز (agarose gel electrophoresis) انجام شد تا اطمینان حاصل شود که RNA خرد نشده باشد. پس از استخراج RNA نمونه‌ها به آزمایشگاه مرکزی دامپزشکی دبی در کشور امارات ارسال شد و با استفاده از پلتفرم Illumina HiSeq 4000 (HiSeq 3000/HiSeq 4000 Systems (discontinued) - Illumina) در دو مرحله مجزا توالی‌یابی شد و ۱۵۰ جفت باز خوانش شد. سپس داده‌های حاصل از توالی‌یابی نسل بعدی (خوانش‌ها) با دقت بالا با استفاده از نرم افزار شناسایی ویروس مبتنی بر وب (*Genome Detective Virus Tool* (Version 2.43) تجزیه و تحلیل شدند و کل ژنوم شناخته شده جمع‌آوری شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی از نظر کیفیت خوانش و کیفیت تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک با استفاده از نرم افزار *FastQC* (bio.tools) (Bioinformatics Tools and Services Discovery Portal) ارزیابی شد. قرائت‌های با کیفیت پایین فیلتر شدند و آداپتورها با استفاده از *Trimomatic* (GVA2020, Created by Daniel Edward Deatherage, last modified on Jun 24, 2020) تریم شده و کوتاه شدند. پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها برای کنترل کیفیت (QC)، داده‌ها با روش هم‌ترازی مبتنی بر پروتئین، *DIAMOND* (protein-based alignment method) با پایگاه داده ژنومی ویروس همراه شدند و قرائت‌های مربوط به ویروس شناسایی شدند و قرائت‌های غیر ویروسی حذف شدند. نمایه سازی و آماده سازی NGS library با کیت آماده سازی (NEBNext Ultra RNA)

و آلی ویو (cleaning based on amino acid information) و آلی ویو (AliView - Alignment Viewer and Editor -) (Ormbunkar.se) هم‌تراز و ویرایش شدند. از نرم افزار BLAST: Basic Local Alignment Search () (جدول ۱ و نگاره ۵). در ادامه جهت تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک و مقادیر هویت زوجی (Pairwise Identity) ابتدا توالی ژنوم خانواده ویروسی توبانی ویریده (Tobaniviridae) از بانک ژن دانلود شد و ژنوم کامل سویه‌های ویروس مرتبط با خزندگان با استفاده از الگوریتم ClustalW (Multiple Sequence Alignment - CLUSTALW - GenomeNet) پیاده‌سازی شده در نرم افزار مگا ایکس (The Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega X)) هم‌تراز شدند (نگاره ۳). علاوه بر این، توالی‌های اسید آمینه ORF1b (RdRp) (open reading frames (ORFs; 1a and 1b) RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)) MAFFT نسخه ۷,۴۰۷ (Multiple) (Alignment using Fast Fourier Transform) با استفاده از پارامترهای (suitable for sequences containing large unalignable regions; recommended for <200 sequences) همسو شدند (جدول ۲); و درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش زنجیره مارکوف مونت کارلو (Trans-dimensional Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) algorithm) و با استفاده از نرم افزار Mr. Bayes (MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees) version 3.2 (Trans-dimensional Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) algorithm) اجرا شد به این ترتیب که دو اجرا مستقل و چهار زنجیره در هر اجرا با استفاده از مدل-GTR (General Time Reversible (GTR) model across lineages along with a gamma (+Γ)) نوکلئوتیدها و مدل WAG (Whelan And Goldman' matrix a new amino acid replacement matrix for globular proteins) برای جایگزینی اسیدهای آمینه بکار برده شد. تحلیل نوترکیبی با نرم افزار

بلاست (Primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Stephen Altschul, Warren Gish, Webb Miller, Eugene Myers, and David Lipman (Developer(s), NCBI-USA) استفاده شد. در این مطالعه سه جفت پرایمر مختلف مورد آزمایش قرار گرفتند. (Reverse transcription polymerase chain reaction) RT-PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رونویسی معکوس) با استفاده از کیت یک مرحله‌ای کیاژن آلمان (Qiagen, Qiagen Str. 1, 40724 Hilden, Germany) انجام و از یک پرایمر فوروارد (5'CAA CTC TGC ACA AAC GCG AA 3' و یک پرایمر ریورس (5'CGG CGA TCT TGA TGT TGC TG 3' (محصول نهایی تقویت شده PCR) یک توالی شامل ۳۵۸ جفت باز بود. پروفایل دمایی (Temperature Profile) شامل یک مرحله رونویسی معکوس (Reverse transcription reactions) involve three main steps: primer annealing, DNA polymerization, and enzyme deactivation) در ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه، یک مرحله فعالسازی (Activation Step) در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس ۴۰ مرحله ۹۴ درجه سانتیگراد (هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه)، ۵۷ درجه سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و همچنین مرحله طولی شدن نهایی یا گسترش نهایی (Final Extension) در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بود. در انتها محصولات PCR با الکتروفورز روی ژل آگارز مشاهده شدند. در نهایت جهت بررسی مقایسه‌ای نتایج به دست آمده قرائت‌های حاصل از نسل بعدی توالی یابی با استفاده از نرم‌افزار CLC Bio (CLC Genomics Workbench Premium 22.0.1 x64 -Bioinformatics, Aarhus Denmark) مونتاژ شدند و کانتیگ‌ها (Contig) و توالی‌های مونتاژ شده، به دست آمده با روش دنوو، با استفاده از نرم افزارهای جنیوس پریم (Geneious Prime® v.2020.2.4) (Kearse), ترانسلیتور ایکس (TranslatorX server) Nucleotide sequence alignment and alignment

مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق با PBS شسته شدند، در ادامه با آنتی بادی ثانویه (Anti-Iba1 antibody (ab5076) (Abcam Biotechnology company, Cambridge, United Kingdom) رقیق شده به نسبت ۱:۵۰۰ (Invitrogen) انکوبه شدند و سپس پنج بار با PBS شسته شدند و به به دنبال آن یک انکوباسیون ۱۵ دقیقه‌ای با سوپسترا (Thermo Scientific™ Pierce™ DAB-Substrat-Kit) انجام شد؛ و زمینه با رنگ همتوکسیلین رنگ‌آمیزی شد در نهایت لامها آماده بررسی شدند.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی میکروبی و کشت سلولی

بررسی‌های باکتریولوژیک سواب‌ها نتایج جالب توجهی به همراه داشت. بطوریکه از نمونه‌های محوطه دهانی و کوان، باکتری‌هایی همچون کوماموناس تستسترونی (Comamonas Testosteroni)، ائتروباکتر کلواک (Enterobacter Cloacae) و استافیلوکوکوس (Staphylococcus spp) و از نمونه‌های مربوط به کلواک نیز باکتری‌هایی همچون سیتروباکتر (Citrobacter spp)، سالمونلا (Salmonella spp) و کورینه باکتریوم (Corynebacterium spp) جداسازی شد که بر اساس رفرنس‌های موجود (۱۱).

همگی جزو فلور طبیعی بدن این خزنده می‌باشند (نگاره ۱). بررسی‌های قارچ شناسی و ویروس شناسی (پارامیکسو ویروس، رتوویروس‌ها، رانا ویروس‌ها، آدنوویروس‌ها) منفی بود. ارزیابی میکروسکوپی مستقیم موکوس کلواک نیز هیچ انگلی را نشان نداد.

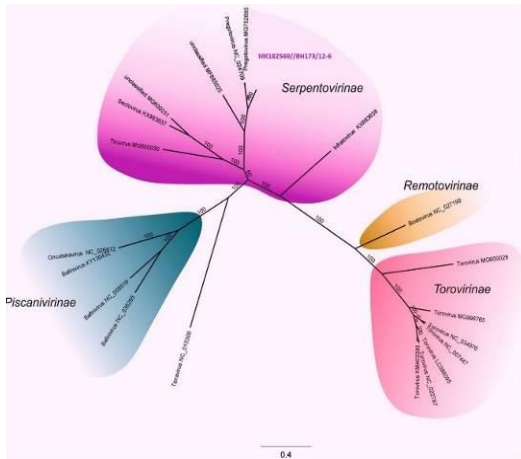
RDP4(Recombination Detection Program (RDP), RDP4 4.1 انجام شد (نگاره ۴).

کالبدگشایی، نمونه برداری، رنگ‌آمیزی و تهیه اسلایدهای پاتولوژیک

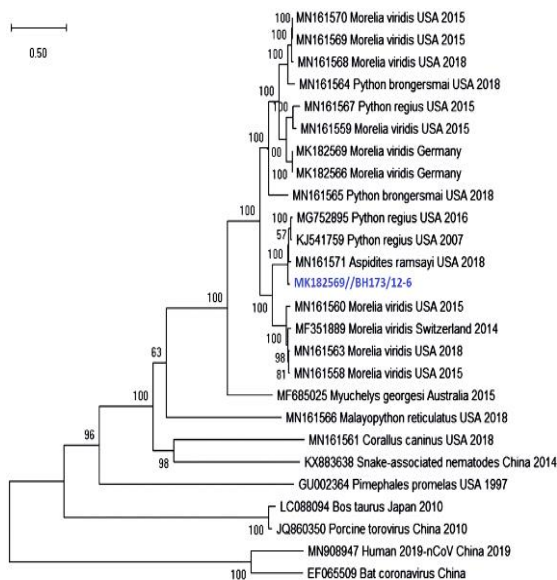
پس از کالبدگشایی، نمونه‌هایی از کلیه اندام‌ها و بافت‌های اصلی (مغز، دستگاه تنفسی، کبد، کلیه، طحال، دستگاه گوارش، دستگاه تناسلی، پانکراس و چشم) جمع‌آوری و در فرمالین بافر ۱۰ درصد برای بررسی‌های بافت‌شناسی تثبیت شد. سپس نمونه‌های بافتی تثبیت شده با فرمالین برش داده شدند و به طور معمول در پارافین قرار گرفتند. سپس مقاطع متوالی (۴-۵ میکرومتر) تهیه و با همتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی شدند و همچنین بر روی آنها رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با اعمال تغییراتی در پروتکل توصیف شده توسط درواس و همکاران در سال ۲۰۱۷ انجام شد (۱۰). در حقیقت بخش‌هایی از تمام اندام‌های بررسی شده از نظر بافت‌شناسی، با استفاده از کیت تشخیصی (Bond Polymer Redefine Red (BPRRDK) (Biosystems Detection kit) شرکت لیکا بیوسیستم (Company, Wetzlar, Germany) شعبه امارات (Perpetual Exposure Leica UAE, Suite 714 Burlington Tower Al Abraj Street Next to The Oberoi Hotel - Dubai - United Arab Emirates) و انکوباسیون ۱۰ دقیقه‌ای با محلول بازیابی اپی توپ (Epitope Retrieval Solution) انجام شد. از ماده NdvNcAb به میزان ۰,۳۲ میکروگرم در میلی لیتر) به‌عنوان آنتی بادی اولیه استفاده شد.

یک توده سلولی از بافت ریه آلوده به نیدوویروس قرار گرفته در پارافین که با فرمالین تثبیت شده و بصورت تجاری در دسترس است به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بخش‌های متوالی با سرم پیش ایمنی به‌جای آنتی‌بادی اولیه خاص به‌عنوان کنترل‌های منفی انکوبه شدند. جهت رنگ‌آمیزی پس از مرحله پارافین، برش‌ها با آنتی بادی NdvNcAb در رقت ۱:۲۰۰۰ (در سالین بافر فسفات، یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و سپس پنج بار و هر بار به

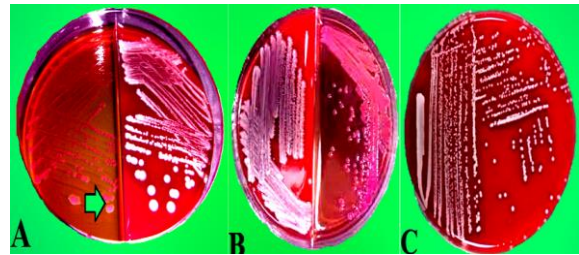
نتایج حاصل از استخراج RNA، NGS و RT-PCR در تصاویر و جدولهای زیر خلاصه شده است:



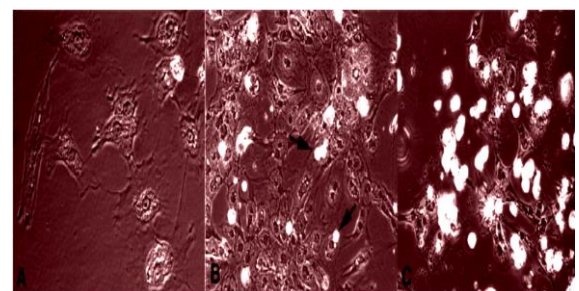
نگاره ۳: درخت فیلوژنتیک توالی‌های نوکلئوتیدی ژنوم کامل از خانواده توبانی ویریده، زیر راسته تورنیدو ویریده (Tornidoviridae). نیدو ویروس شناسایی شده در این مطالعه به رنگ بنفش مشخص شده است.



نگاره ۴: درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش زنجیره مارکوف مونت کارلو با استفاده از نرم افزار Mr. Bayes رسم شده است. طول هر کدام از شاخه‌ها با نوار مقیاس و بصورت عددی نشان داده شده است. سویه شناخته شده در ایگوانا با رنگ آبی نمایش داده شده است.



نگاره ۱: جداسازی باکتریهای کوموناس تستسترونی، انتروباکتر کلوآک و استافیلوکوکوس از نمونه‌های محوطه دهانی و کوان ایگوانا (A) کوموناس تستسترونی بر روی محیط کشتهای آگار خون دار گوسفند سمت راست و محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار سمت چپ، ضخامت قطر کلنی‌ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد ۱ میلی متر بود. کلنی‌های تشکیل شده روی آگار خون دار خاکستری، صاف، کامل، کمی برآمده و غیر همولیتیک بودند (کلنی‌های شکل گرفته به رنگ صورتی بر روی ائوزین متیلن بلو آگار با فلش نشان داده شده است). (B) کلنی‌های تشکیل شده از انتروباکتر کلوآک بر روی محیط کشت مک کانکی آگار. (C) کلنی‌های تشکیل شده از استافیلوکوکوس بر روی محیط کشت آگار خون دار، کلنی‌هایی با اندازه متوسط، برجسته و درخشان تشکیل شد رنگ آنها از خاکستری متمایل به سفید تا زرد و حتی نارنجی متغیر بود.



نگاره ۲: جداسازی ویروس در کشت سلولی قلب ایگوانا (IgH-2) (الف) سلول‌های کنترلی غیر عفونی. (B, C) سلول‌ها پس از تلقیح با سوسپانسیون‌های تهیه شده از بافت‌های ریه، کلیه و مغز ایگوانای تحت مطالعه. اولین شواهد اثر سیتوپاتیک پس از ۲ روز (B) به صورت بزرگ شدن، گرد شدن و واکوئل شدن سیتوپلاسمی و همچنین از دست دادن چسبندگی (فلش) مشاهده می‌شود. پس از ۶ روز (C)، مایع رویی (سوپرناتانت) غلیظ از سلول‌های آلوده، رنگ‌آمیزی منفی (Negative staining).

نتایج حاصل از استخراج RNA، NGS و RT-PCR

جدول ۱: مشخصات کلی نیدو ویروس شناسایی شده بر اساس یافته‌های متانومیک

ردیف	قطعه ژنومی	I	s
۱	Length of the segment (nt)	۶۸۵۹	۱۸۲۳
۲	Reference	UHV-3(KR870032)	UHV-3(KR870019)
۳	Coverage to reference	%۱۰۰	%۵۷٫۸
۴	Length of the 50 end (nt)	۸۷	ND
۵	Length of the OFR (nt)	۶۲۰۷	۱۴۰۸
۶	Encoded protein	Z	NP
۷	Protein size (aa)	۲۰۶۸	۵۸۴
۸	Length of the IGR (nt)	۱۷۲	۱۱۱
۹	Length of the 30 end (nt)	۵۳	۳۲

جدول ۲: تجزیه و تحلیل حوزه‌های عملکردی (Functional Domains) در چارچوبهای خوانش باز (ORF) شناسایی شده در ژنوم نیدو ویروس ایگوانا بوسیله نرم افزار MAFFT نسخه ۷٫۴۰۷ با استفاده از پارامترهای E-INS-i

ORF	Family identifier	Pfam accession no.a	Alignment		Bit score	E value		Description
			Start position	End position		Independence	Conditional	
	Methyltransf_25	PF13649.5	3075	3150	15.08	0.027	4.80E-06	Methyltransferase domain
ORF1a	zf-CCCH	PF00642.23	1052	1072	12.09	0.13	2.40E05	Zinc finger C-X8-C-X5-C-X3-H type
	zf-CCCH	PF00642.23	1098	1117	9.91	0.64	0.00011	Zinc finger C-X8-C-X5-C-X3-H type
	NSP13	PF06460.11	2077	2239	50.2	1.80E-13	1.20E16	Coronavirus NSP13
ORF1b	Viral_helicase1	PF01443.17	1144	1380	45.91	5.20E-12	3.40E15	Viral (superfamily 1) RNA helicase
	AAA_30	PF13604.5	1101	1231	42.93	3.90E11	2.60E14	AAA domain
	RdRP_1	PF00680.19	479	651	40.69	1.00E10	6.60E14	RNA-dependent RNA polymerase
ORF5	AAA-19	PF13245.5	1100	1229	33.98	3.10E08	2.00E11	AAA domain
	Arteri-nucleo	PF01481.15	32	132	23.35	5.50E05	9.90E09	Arterivirus nucleocapsid protein

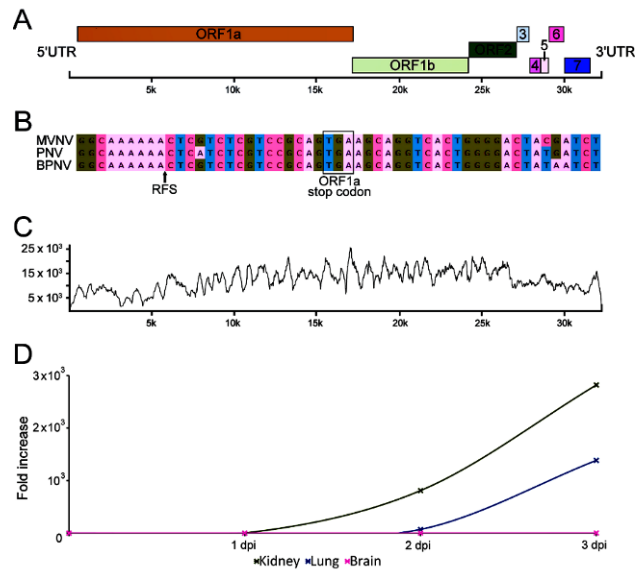
رشد ویروس در رده‌های سلولی مختلف. مایع رویی کشت سلولی رده‌های سلولی مشخص شده تلقیح شده با ماده حاوی نیدو ویروس توسط RT PCR در نقاط زمانی مشخص شده آنالیز شد. افزایش برابری (fold increase): افزایش برابری به‌عنوان نسبت یک عدد افزایش یافته به عدد اصلی تعریف می‌شود. به‌عنوان مثال، عدد اصلی ۱۵ و عدد نهایی ۳۰ افزایش ۲ برابری خواهد بود ($2=15/30$). نشان دهنده افزایش مقدار RNA ویروسی در مایع رویی کشت سلولی در مقایسه با مقدار شناسایی شده در 0 dpi است.

نتایج حاصل از معاینه بالینی

در معاینات بالینی علائم عمومی شامل بی‌اشتهایی، کاهش وزن، بی‌حالی، کم‌آبی، پوست اندازی ناقص و نامناسب، همچنین علائم تنفسی فوق‌حاد شامل افزایش مقدار ترشحات مواد شفاف و مخاطی در بینی و دهان و نیز علائم التهاب دهان (استوماتیت)، خس‌خس سینه، تنفس با دهان باز، افزایش تعداد تنفس و سرفه و کدورت لایه شفاف روی چشم (اسپکتاکولیت) (نگاره ۱۳) و نیز پوسته پوسته شدن غشای شفاف چشم مشاهده شد.



نگاره ۶: نتایج مشاهدات بالینی A بی‌حالی، کم‌آبی، پوست اندازی ناقص و نامناسب. B افزایش مقدار ترشحات مواد شفاف و مخاطی در دهان و نیز علائم التهاب دهان (استوماتیت). C. تجمع مواد کازئوزی در کوان داخلی (Internal Choanae) به رنگ سفید بوضوح دیده می‌شود همچنین مخاط کام هم ضمیم شده و حالت نکروزه دارد

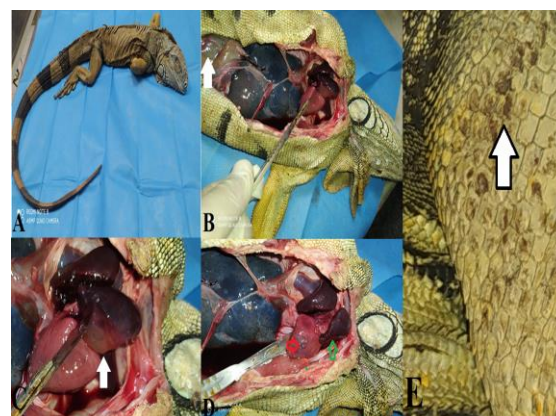


نگاره ۵: ساختار ژنومی نیدو ویروس شناسایی شده ایگوانا براساس توالی یابی نسل بعدی و رابطه فیلوژنتیکی با ویروس‌های مرتبط. (A): نگاره شماتیک از مناطق ترجمه نشده (UTRs) و چارچوب خوانش باز (ORFs) (چارچوب خوانش باز، یک توالی پیوسته از کدون‌هایی است که هم حاوی کدون شروع‌کننده (معمولاً AUG) و هم کدون خاتمه دهنده (معمولاً UAA, UAG, UGA) است). از قطعه nt ssRNA¹³²⁴¹⁴ ژنوم نیدو ویروس. (B): هم ترازوی در اطراف سیگنال تغییر چارچوب ریبوزومی (تغییر چارچوب ریبوزومی، یا تغییر چارچوب ترجمه یا رمزگذاری مجدد ترجمه، پدیده زیستی است که در حین ترجمه رخ می‌دهد و منجر به تولید پروتئین‌های متعدد و منحصر به فرد از یک آر‌ان‌ای پیام‌رسان خاص می‌شود. این فرایند را می‌توان توسط توالی نوکلئوتیدی آر‌ان‌ای پیام‌رسان برنامه‌ریزی کرد و گاهی تحت تأثیر ساختار دوم اسید نوکلئیک قرار می‌گیرد). (در بخش هم ترازوی و پیش‌بینی ساختاری با فلش نمایش داده شده است) در نیدو ویروس شناسایی شده در ایگوانا. کدون متوقف‌کننده (ORF1a) هایپلایت شده است. پیش‌بینی ساختار RNA در اطراف RFS در نیدو ویروس شناسایی شده نشان داده شده است. (C): پوشش کانتینگ (وربست یا کانتینگ، قطعات پیوسته‌ای از توالی دی‌ان‌ای است که توسط بازسازی توالی خوانده‌های یک کروموزوم تولید می‌شود. در اصل کانتینگ به مانند نقشه‌ای از دی‌ان‌ای کروموزوم است که که نقاطی که قطعات پیوسته با هم همپوشانی دارند را مشخص می‌کند. به‌طور کلی در یک کانتینگ از توالی نوکلئوتیدی‌های به دست آمده اطمینان حاصل شده است). محور y تعداد خوانش‌هایی را نشان می‌دهد که با هر موقعیت نوکلئوتیدی (محور x) از contig مطابقت دارد. (D):

نتایج کالبدگشایی

یافته‌های ماکروسکوپیک

در کالبدگشایی وضعیت بدنی نامناسب و آتروفیک بود (نگاره ۶). در بازرسی پوشش بدن علایمی از پوست اندازی نامناسب، دهیدراتاسیون و کانون‌های برنزه تا زرد رنگ بر روی پوست قسمت شکمی ران مشاهده شد (نگاره ۷). در ناحیه سر و صورت تورم دو طرفه پلکها و ورم ملتحمه مشهود بود. جراحات ماکروسکوپیک مشاهده شده در محوطه دهانی و ابتدای مری شامل اریتم و قرمزی همراه با ترشحات موکوسی خفیف در محوطه دهانی و ابتدای قدامی مری بود (نگاره ۶). نای و ریه‌ها توسط یک لایه مخاطی پوشیده شده بودند. همچنین ماده موکوسی بر روی فضای فوئولار (Faveolar Spaces) و کیسه‌های هوایی پشتی (Caudal Air Sacs) در ریه‌ها قابل مشاهده بود. ریه‌ها اندکی افزایش ضخامت یافته و به رنگ قرمز تیره درآمده بودند بخصوص این تغییر رنگ در بخش قدامی ریه بسیار بیشتر از بخش خلفی قابل مشاهده بود (نگاره ۷-C). همچنین کاهش قابل توجهی از میزان بافت چربی ذخیره‌ای در بدن همراه با تغییر رنگ صورتی تا قرمز در حفره کولومیک خلفی دید می‌شد. سایر ارگان‌های بدنی نیز در جاتی از تورم و ادم را نشان می‌دادند (نگاره ۷-D).



نگاره ۷: یافته‌های ماکروسکوپیک کالبدگشایی ایگوانا: A و E) علایمی از پوست اندازی نامناسب، دهیدراتاسیون (A) و کانون‌های

برنزه تا زرد رنگ بر روی پوست قسمت شکمی ران مشاهده شد (E). میزان بافت چربی ذخیره‌ای در بدن همراه با تغییر رنگ صورتی تا قرمز در حفره کولومیک خلفی دید می‌شد (پیکان سفید رنگ). C) ریه‌ها توسط یک لایه مخاطی پوشیده شده بودند. همچنین تجمعات اکسوداتیو بر روی فضای فوئولار و کیسه‌های هوایی پشتی در ریه‌ها قابل مشاهده بود. D) ریه‌ها بطور قابل توجهی ضخیم و به رنگ قرمز تیره درآمده بودند بخصوص این تغییر رنگ در بخش قدامی ریه بسیار بیشتر از بخش خلفی قابل مشاهده بود (پیکان سبز) همچنین کانون‌هایی از تجمع مواد فیبرینه بر روی پریکارد قلب مشاهده شد (پیکان قرمز).

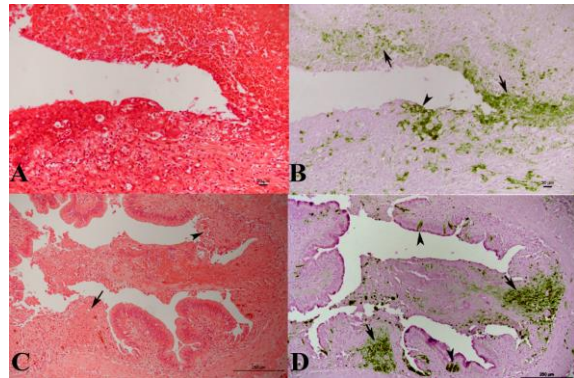
یافته‌های میکروسکوپیک

حفره دهانی و دستگاه تنفس

بررسی نتایج ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک دستگاه تنفس توزیع متغیر عفونت و ضایعات ویروسی را در قسمت‌های مختلف این دوبخش نشان داد. نکروز اپیتلیال گسترده چند کانونه و مشاهده هسته‌های آپوپتوتیک را همراه با نفوذ گسترده هتروفیل‌ها، لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها و پلازما سلها به فضای زیراپیتلیومی مخاطات تنفسی و همچنین بافت‌های سنگفرشی مجاور را نشان داد. همچنان که در نگاره‌های ۸ و ۹ مشخص است ضایعات پاتولوژیک ایجاد شده با مقادیری از فیبرین، سلول‌های اپیتلیال دژنره شده و هتروفیل‌ها پوشانده شده اند که نشان دهنده وقوع رینیت فیبرینونکروتیک و استوماتیت است (نگاره ۸-A)؛ نوکلئوپروتئین نیدوویروس به وفور در سلول‌های سالم و دژنره اپیتلیال محوطه دهانی و بینی بیان شد (نگاره ۸-B). همچنین بروز نوکلئوپروتئین نیدوویروس با استفاده از آنتی بادی NdvNcAb و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی Hemalaun-eosin counterstain در تعداد معدودی از سلول‌های اپیتلیوم تنفسی در نای، برخی از سلول‌های ترابیکولار اپیتلیوم شبه مطبق ریه و نیز پنوموسیت‌های نوع I که فضای فائولار را پوشانده اند دیده شد از دیگر یافته‌های این قسمت تراکتیت مزمن منتشر همراه با ارتشاح زیر بافت

پیرامون عروقی چند کانونه پیوگرانولوماتوزی همراه با نفوذ ماکروفاژها، هتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها دیده شد که عمدتاً در قسمتهای زیر مخاط و در مجاورت بافتهای لنفوی اطراف روده (GALT: The gut-associated lymphoid tissue) همراه با نفوذ خفیف به داخل لایه عضلانی (Tunica Muscularis) اتفاق افتاده بود. (نگاره ۹- A و C). همچنین بیان وسیع نوکلئوپروتئین نیدوویروس در ماکروفاژهای نفوذی (Infiltrating Macrophages) مشاهده شد (نگاره ۹- B و D). همچنین موارد معدودی از دژنرسانس فیبرینوئید دیواره عروق همراه با نفوذ هتروفیل در داخل دیواره دیده شد. از دیگر یافته‌های میکروسکوپی در سیستم عروقی دیدن واسکولیت پیوگرانولوماتوز چند کانونه و پری واسکولیت در وریدها و شریان‌های کوچک، متوسط و بزرگ در سطح سروزی اندام‌های مختلف مانند قلب، ریه و تیموس بود (نگاره ۱۲- B و C). ضایعات پیوگرانولوماتوز چند کانونه شامل یک ناحیه مرکزی از نکروز بود که توسط ماکروفاژهای مملو از نیدوویروس (virus-laden macrophages) احاطه شده بود در این قسمتها علاوه بر ماکروفاژهای نفوذی در سلول‌های اندوتلیال غالباً فعال (نگاره ۹- D). همچنین در سلول‌های تک هسته‌ای موجود در لامینای عروق (نگاره ۹- D و نگاره ۱۱- A) نیز بیان وسیع نوکلئوپروتئین نیدوویروس مشاهده شد. رنگ‌آمیزی با آنتی بادی ثانویه (Anti-Iba1 antibody (ab5076) (مارکر تشخیصی وجود Iba1 در مونوسیتها و ماکروفاژها) نشان داد که سلول‌های تک هسته‌ای در لامینای عروق عمدتاً مثبت هستند. جراحات مشاهده شده بصورت وسیع در اندامهای مختلف شامل کلیه‌ها، تیموس، قلب و کبد و ریه مشاهده شد. همچنین ضایعات پیوگرانولوماتوز و فیبرینوکروتیک در اویداکت همراه با وقوع سلومیت فیبرینی در حفره سلومیک خلفی و در مجاورت اویداکت ملتهب دیده شد. بطور کلی حجم وسیع ضایعات

پوششی لنفوسیت‌ها، پلاسماسل‌ها، ماکروفاژها و ندرتا هتروفیل‌ها بود.



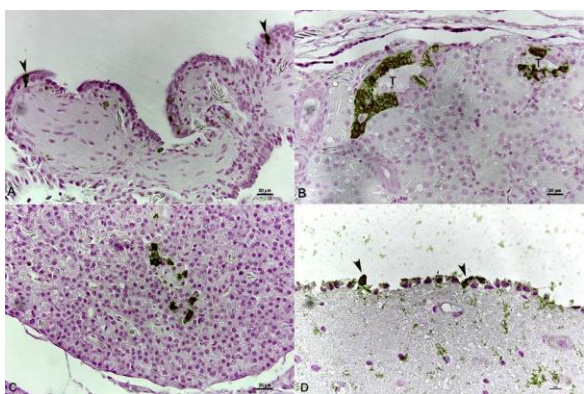
نگاره ۸: یافته‌های میکروسکوپی در مسیره‌های تنفسی و مری: (A) رینیت شدید فیبرینوکروتیک (نوارمقیاس ۲۵۰ میکرومتر). (B) بیان گسترده نوکلئوپروتئین نیدوویروس که هم در نواحی نکروزه و بدون سلول (پیکان سیاهرنگ) و هم در بین اپیتلیوم سلولی مشاهده می‌گردد (سر پیکان سیاهرنگ). (نوارمقیاس ۲۵۰ میکرومتر). (C) ازوفازیت فیبرینوکروتیک چند کانونه شدید (سر پیکان و پیکان سیاهرنگ به ترتیب موقعیت نواحی نکروز شده بدون سلول و بین اپیتلیوم سلولی را نشان می‌دهد) (نوارمقیاس ۲۵۰ میکرومتر). (D) بیان نوکلئوپروتئین نیدوویروس که هم در نواحی نکروزه و بدون سلول (پیکان سیاهرنگ) و هم در بین اپیتلیوم سلولی هایپرپلاستیک آلوده مشاهده می‌گردد (سر پیکان سیاهرنگ) (نوارمقیاس ۲۵۰ میکرومتر). (A و C رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، B و D رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی

Hemalaun-eosin counterstain

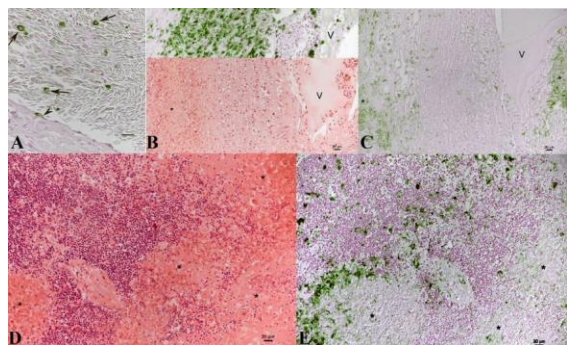
دستگاه گوارش

علاوه بر تغییرات در مخاطات تنفسی، در دستگاه گوارش هم علائمی از وقوع ازوفازیت شدید فیبرینوکروتیک چند کانونه و وقوع درجاتی از مرگ سلولی همراه با بروز وسیع نوکلئوپروتئین نیدو ویروس در سلول‌های سالم و دژنره اپیتلیال سنگفرشی دیده شد (نگاره ۸- C و D). همچنین انتریت فیبرینوکروتیک چند کانونه همراه با بیان نوکلئوپروتئین نیدوویروس در انتروسیت‌های سالم و نیز در حال تخریب دیده شد (نگاره ۹- A و B). همچنین تغییرات روده‌ای همراه با بروز ضایعات مخاطی و نیز ایجاد فرآیندهای التهابی کانونی در دیواره روده بصورت ارتشاح

۲۰ میکرومتر). (B) نمای نزدیکتر از نکروز کانونی، همراه با وجود یک ناحیه مرکزی نکروزه (ستاره سیاهرنگ) که توسط ماکروفازهای متعدد احاطه شده است. بیان شدید نوکلئوپروتئین نیدوویروس در هپاتوسیت‌ها و اندوتلیوم نکروز یافته دیده می‌شود. همچنین بیان آنتی ژن ویروسی نیز در داخل سلول‌های کوپفر با سر پیکان سیاهرنگ نشان داده شده است. رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی Hemalaun-eosin counterstain. (نوارمقیاس ۵۰ میکرومتر).

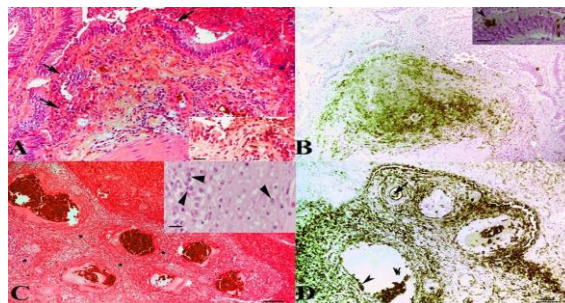


نگاره ۱۱: بیان نوکلئوپروتئین نیدوویروس در سلول‌های اپیتلیوم بافتهای مختلف (A) ریه. بیان نوکلئوپروتئین نیدوویروس در سلول‌های اپیتلیال تنفسی نکروز شده و ریخته (سر پیکان سیاهرنگ) (نوارمقیاس ۲۰ میکرومتر). (B) کلیه. بیان نوکلئوپروتئین نیدوویروس در اپیتلیوم توبولهای کلیوی. لومن توبولها با حرف T نشان داده شده است (نوارمقیاس ۲۰ میکرومتر). (C) پانکراس. بیان نوکلئوپروتئین نیدوویروس در سلول‌های اپیتلیال مجرای پانکراس نشان داده شده است (نوارمقیاس ۲۰ میکرومتر). (D) مغز. بیان نوکلئوپروتئین نیدوویروس در سلول‌های اپاندیمی مفروش کننده بطن مغز (سر پیکان سیاهرنگ) (نوارمقیاس ۱۰ میکرومتر). رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی Hemalaun-eosin counterstain



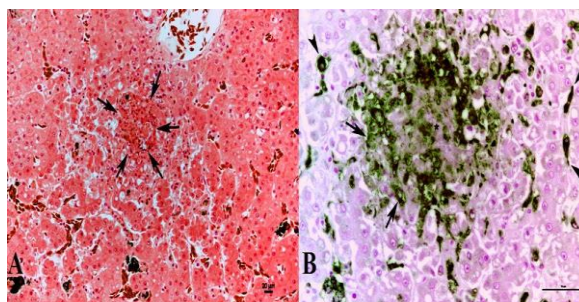
نگاره ۱۲: یافته‌های میکروسکوپی در عروق خونی: (A و B) درگیری عروق خونی و مونوسیت‌ها ناشی از ویرمی. (A) ریه، رگ خونی. بیان نوکلئوپروتئین نیدوویروس در مونوسیت‌های موجود در گردش خون

هیستوپاتولوژیک نشان دهنده گسترش سیستمیک گسترده ویروس بود.



نگاره ۹: یافته‌های میکروسکوپی در روده: (A) انتریت فیبرینونکروتیک چند کانونی شدید همراه با زخم (پیکان سیاهرنگ) در روده باریک همراه با لومن پر از خون مشاهده می‌شود (نوارمقیاس ۲۰ میکرومتر). ارتشاح پیرامون عروقی کانونی شدید و التهاب فیبرینونکروتیک سطحی در نگاره داخلی کوچک سمت راست با فلش نشان داده شده است. (نوارمقیاس ۲۰ میکرومتر). (B) نوکلئوپروتئین نیدوویروس به وفور در داخل ترشحات التهابی فیبرینی بیان شده است. (نوارمقیاس ۵۰ میکرومتر). همچنین بیان نوکلئوپروتئین نیدوویروس در انتروسیت‌های سالم در مجاورت زخم اولسره در نگاره کوچک بالا سمت راست با فلش نشان داده شده است. (نوارمقیاس ۲۰ میکرومتر). (C) ایجاد نکروز فیبرینوئید در دیواره عروق سرخرگی روده بزرگ (نوارمقیاس ۱۰۰ میکرومتر). (حضور گسترده ماکروفازها در داخل ترشحات التهابی بوسیله فلشهای سیاهرنگ در نگاره کوچک سمت راست بالا نشان داده شده است). (نوارمقیاس ۲۰ میکرومتر). (D) بیان گسترده نوکلئوپروتئین نیدوویروس در داخل ترشحات التهابی و نیز در داخل لکوسیت‌های داخل عروقی و سلول‌های اندوتلیال عروقی (سر پیکان سیاهرنگ) (نوارمقیاس ۲۰ میکرومتر). (A و C رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین، B و D رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی

Hemalaun-eosin counterstain.



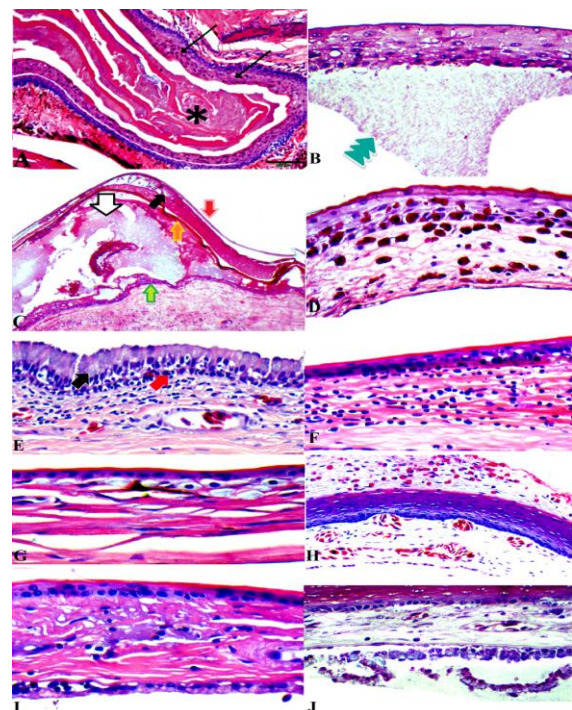
نگاره ۱۰: یافته‌های میکروسکوپی در کبد: (A) گرانولوم کانونی در کبد (پیکان سیاهرنگ). رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین (نوارمقیاس

(ستاره) پر شده است. (B) تجمع اکسودای التهابی و ادماتوز (پیکان سبز رنگ) بین غشای پایه و سلولهای بازال موجود در اپیتلیوم سطحی چشم راست (C) دو لایه شدن بخش شاخی شده اسپکتیکل و ایجاد ادم در هر دو لایه آلفا کراتین (پیکان قرمز لایه بتا کراتین سالم، پیکان سیاه شکل گیری ادم در زیر لایه بتا کراتین سالم، پیکان سفید شکل گیری ادم در بین دو لایه آلفا کراتین، پیکان نارنجی لایه آلفا کراتین دوم و پیکان سبز لایه آلفا کراتین اول را نشان می‌دهد. چشم راست، هر دو بخش با لایه‌های بتا کراتین سالم پوشانده شده اند. (D) گرانولوسیت‌های اسیدوفیلیک (هتروفیل‌ها) در لایه ژرمینال و در سراسر استرومای چشم چپ دیده می‌شوند. (E) ناحیه ترانزیشن اسپکتیکل چشم چپ. لنفوسیت‌ها (پیکان قرمز) در اپیتلیوم خارجی بلافاصله در قسمت بالای غشای پایه دیده می‌شوند. سلولهای پوششی بصورت ستونی دیده می‌شوند و هسته‌های آنها در قسمت بازال قرار دارد. سیتوپلاسم این سلول‌ها حاوی وزیکول‌های مخاطی (پیکان سیاه) است. (F) ارتشاح لنفوسیتی در استروما دیده می‌شود. (G) ملانوماکروفاژها (کروماتوفورها) در استروما و در امتداد غشای پایه اپیتلیوم خارجی کاملاً مشخص هستند. فضاهای شفاف در استروما به دلیل آسیب به بافت در حین تهیه اسلایدهای پاتولوژیک وجدا شدن الیاف کلاژن در طول پردازش بافتی اتفاق افتاده است. (H) نئواسکولاریزاسیون استروما. جابجایی بیرونی اپیتلیوم خارجی به دلیل فشار ناشی از رگ خونی و همچنین حضور هتروفیل‌های متعدد در لایه‌های کراتین اپیتلیوم خارجی کاملاً مشخص است. (I) دژنراسانس کلاژن همراه با بی‌نظمی فیبرهای کلاژن در استروما و هیپرتروفی اپیتلیوم داخلی چشم چپ مشخص است. (J) نمای واضح تر سلولهای هیپرتروفی شده اپیتلیوم داخلی سلولهای نکروزه کننده شده و با ادم فضای زیر چشم چپ مخلوط شده اند.

بحث

ما مطالعه حاضر را با اصرار برای شناسایی عامل ایجاد پنومونی کشنده مشاهده شده در ایگوانای سبز معمولی که با تجمع مواد مخاطی در راه‌های هوایی و ضخیم شدن قابل توجه بافت اپیتلیوم ریه مشخص شد، آغاز کردیم. توالی یابی نسل بعدی حضور یک نیدوویروس جدید را نشان داد که توسط آنالیز فیلوژنتیک مشخص شد که در گروه توروویروس‌ها طبقه بندی می‌شود، RT-PCR، هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستولوژی برای تایید ارتباط این ویروس با بیماری و نیز شناسایی سلول‌های

(پیکان سیاهرنگ) و همچنین در سلول‌های اندوتلیال (سر پیکان سیاهرنگ) دیده می‌شود. (نوارمقیاس ۱۰ میکرومتر). رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی Hemalaun-eosin counterstain (B و C): ریه، شریانهای ریوی. (B) اینفیلتراسیون ترانس مورال خفیف تک هسته ایها و اینفیلتراسیون لکوسیت‌ها تا نکروز مشخص پیرامون عروقی (در نگاره بخش بالا سلول‌های نفوذی که عمدتاً ماکروفاژها هستند با ستاره سیاهرنگ نشان داده شده است) و بیان نوکلئوپروتئین نیدوویروس بصورت شدید دیده می‌شود. (C) بیان شدید نوکلئوپروتئین نیدوویروس در سلول‌های التهابی اینفیلتره شده به ناحیه، لومن عروق با حرف V نشان داده شده است. (نوارمقیاس ۲۰ میکرومتر). (D و E) بافت تیموس. (D) نواحی کانونی نکروز در بافت تیموس (ستاره‌های سیاهرنگ)، توسط ماکروفاژهای فراوانی که از لحاظ بیان نوکلئو پروتئین نیدوویروسی مثبت هستند احاطه شده اند. (E) بیان نوکلئو پروتئین نیدوویروس در نواحی نکروز و بدون سلول دیده می‌شود. (نوارمقیاس ۲۰ میکرومتر) B و D رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، الف، نگاره کوچک B, C و E رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی Hemalaun-eosin counterstain.



نگاره ۱۳: نتایج میکروسکوپی آسیب‌شناسی چشم در ایگوانا و ایجاد کدورت در لایه شفاف روی چشم (spectaculitis) (۱۲): (A) درگیری چین ملتحمه‌ای (فورنیکس) ملتحمه چشم راست (conjunctival fornix)، اپیتلیوم ملتحمه ضخیم و کراتینه شده است (پیکان‌های سیاهرنگ) و فورنیکس با بقایای کراتین ائوزینوفیلیک

سورفکتانت خزندگان به دلیل ترکیب فسفولیپیدی آن که با سایر حیوانات متفاوت است، احتمالاً برای تثبیت راه هوایی اهمیت کمتری دارد، بلکه بیشتر به عنوان یک عامل ضد چسبندگی (ضد چسب) عمل می‌کند؛ و یک عامل ضد ادم در فضای فاوئولار است (۱۶)؛ بنابراین کاهش در مقدار سورفکتانت می‌تواند به دیسترس تنفسی مشاهده شده در این ایگوانا اضافه کرده باشد. افزایش میزان نوزایش و هیپرپلازی اپیتلیوم در بیماری‌های متعدد کروناویروسی، مانند برونشیت عفونی در جوجه‌ها (infectious bronchitis in chickens)، عفونت ویروس بردا در گوساله‌ها (Breda virus infection in calves) و عفونت کروناویروس در موش‌ها (coronavirus infection in rats) توصیف شده است (۱۷). با این حال، تاکنون مکانیسم‌های زیربنایی این فرآیند توضیح داده نشده است. اعضای زیر خانواده توروویرینه همچنین به عنوان القا کننده آپوپتوز سلول‌های اپیتلیال نیز شناخته شده‌اند (۱۸). با این حال، اگرچه یافته‌های ما به این موضوع اشاره دارد، مطالعات بیشتری برای روشن شدن اینکه آیا این موضوع در مورد این نیدو ویروس ایگوانا نیز صدق می‌کند، مورد نیاز است. بطور کلی یافته‌های پاتولوژیک این مطالعه نشان داد که مرگ به دلیل اختلال در تبادلات گازی در نتیجه از بین رفتن پنوموسیت‌های نوع I اتفاق افتاده است. اگرچه توروویروس‌ها عمدتاً با بیماری‌های روده‌ای مرتبط هستند، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که می‌توانند هم آنتر و هم پنوموتروپیک باشند (۱۹). نیدوویروس‌های جدید اخیراً در چندین گونه از خزندگان و بخصوص در انواعی از مارهای مبتلا به بیماری‌های تنفسی یافت شده‌اند، اما هنوز رابطه علی بین عفونت و بیماری ثابت نشده است (۲۰). در این مطالعه علاوه بر اینکه برای اولین بار ابتلای به این ویروس در یک گونه جدید از خزندگان شناسایی شد توانسته شد با بررسی دقیق هیستوپاتولوژی ضایعات مشاهده شده در ارگانهای

هدف ویروس، یعنی سلول‌های اپیتلیال راه‌های هوایی و لومن ترایکولها و همچنین پنوموسیت‌های فاوئولار تیپ I و III انجام شد. در این مطالعه مشخص شد که عفونت نیدوویروس با هیپرپلازی عمومی راه هوایی و اپیتلیوم ریه مرتبط است که فعالیت تکثیری مشخص و درجه‌ای از مرگ سلولی آپوپتوز را نشان می‌دهد. این یافته‌ها با هم نشان می‌دهد که عفونت نیدوویروس میزان نوزایش و ترن اور بافتی اپیتلیوم را افزایش می‌دهد. تجمع موکوس در بخش هدایتی هوای سیستم تنفسی با افزایش قابل توجهی در تعداد سلول‌های اپیتلیال ترش‌حی در ترایکول‌ها و در نوموسیت‌های تغییر یافته تیپ II در فاوئول همراه بود که نشان دهنده افزایش تولید مخاط و یا سورفکتانت است. این نتایج نشان می‌دهد که نیدوویروس شناسایی شده در این مطالعه اپیتلیوم تنفسی و فاوئولار تمایز یافته را آلوده و آسیب می‌رساند و پس از ایجاد آسیب همچنان در موضع باقی مانده و باعث افزایش نوزایش و ترن اور سلول‌های اپیتلیال آلوده می‌شود. بدیهی است که هیپرپلازی نوموسیت‌های تیپ II مشاهده شده در این مطالعه مختص عفونت نیدوویروس در خزندگان نیست، زیرا در خزندگان آسیب نوموسیت‌ها به عنوان پیامد طیف وسیعی از بیماری‌های عفونی با منشاء ویروسی، باکتریایی و فارچی معرفی شده است (۱۳). در پستانداران، هیپرپلازی پنوموسیت نوع II نیز بخشی از مکانیسم دفاعی ریه در برابر عوامل آسیب رسان متعدد است (۱۴). در این مطالعه، سلول‌های اپیتلیال هیپرپلاستیکی، گرانول‌های سروزی مخاطی سیتوپلاسمی فراوانی را به جای لاملار بادیه‌های (lamellar bodies) (otherwise known as lamellar granules, membrane-coating granules (MCGs), keratinosomes or Odland bodies) تولید کننده سورفکتانت نشان دادند (۱۵). این نشان دهنده تولید و انتشار موکوسی بیش از حد و کاهش تولید و انتشار سورفکتانت است و یافته‌های بالینی را توضیح می‌دهد (۱۳). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که

کبد و مغز است. آنتی ژن ویروسی در اپیتلیوم قسمتهای انتهایی مری و دستگاه گوارش شناسایی نشد، اما با IHC در لومن دستگاه گوارش وجود داشت و RNA ویروسی در این نمونه‌ها با RT-PCR شناسایی شد. این نشان می‌دهد که اپیتلیوم دستگاه گوارش محل تکثیر ویروسی نیست، اما دستگاه گوارش مجرای برای انتقال ویروس است که بعد از بلعیده شدن از طریق مدفوع منتقل می‌شود. علاوه بر این، آنتی ژن ویروسی در بافتهای لنفوئیدی مرتبط با مخاطات قسمتهای انتهایی مری، روده کوچک و کولون نیز شناسایی شد. مطالعات اخیر نشان داده است که علل اولیه ویروسی پنومونی در ایگواناها شامل پارامیکسو ویروسها (Paramyxovirus) و رئو ویروسها (Reovirus) and (Ferlaviruses) می‌باشد (۲۱). سایر علل پنومونی پرولیفراتیو عبارتند از کلامیدوفیلوز، مایکوپلاسموز، عفونت مزمن باکتریایی یا انگلی یا قرار گرفتن در معرض سموم (۲۲). در گزارشات قبلی ثبت شده از ابتلای سایر خزندگان به نیدو ویروس، درجات پنومونی مرتبط با عفونت نیدوویروس در زمان مرگ در مقایسه با مطالعه ما پیشرفته‌تر بود (۵). ایگواناها ظرفیت مصرف اکسیژن زیادی دارند و بنابراین به ندرت علائم بالینی بیماری تنفسی را نشان می‌دهند تا زمانی که ظرفیت تبادل اکسیژن به شدت محدود شود (۲۳). یک گزارش اخیر در ایگوانای سبز نشان داد که عفونت سلول‌های اپیتلیال تنفسی و فائولار با آپوپتوز، تکثیر و حضور تعداد بالایی از گرانول‌های سרוزی مخاطی در سیتوپلاسم مرتبط است (۲۴). تکثیر سلول‌های اپیتلیوم تنفسی و تولید موکوس منجر به مهار مکانیکی و فیزیولوژیکی پروسه تبادلات گازی در ریه‌ها و در نتیجه مرگ می‌شود. تصور می‌شود که تولید بیش از حد موکوس در حفره دهان و راه هوایی فوقانی از طریق انسداد راه هوایی و گلوت به مشکلات تنفسی کمک می‌کند؛ بنابراین، اثرات مکانیکی انسدادی مخاط همچنین

مختلف و ایجاد یک مدل مفهومی، رابطه بین عفونت نیدوویروس و بیماریهای تنفسی ثابت شود. یافته‌های ما نشان می‌دهد که عفونت نیدوویروس باعث التهاب مخاطی مشخص در قسمتهای بالای دستگاه تنفسی و قسمتهای قدامی مری همراه با پیشرفت به سمت پنومونی بینابینی پرولیفراتیو می‌شود. این یافته‌ها با گزارش‌های قبلی عفونت نیدوویروس در انواع متعددی از مارها سازگار است (۱۰). در مطالعه ما، مشخصه بالینی این بیماری تولید بیش از حد ترشحات مخاطی در حفره دهان بود که از نظر بافت شناسی با التهاب مشخص (نگاره ۶-B) همراه بود. علاوه بر این، وقوع ازوفازیت شدید در قسمتهای قدامی مری، مشابه آنچه در گزارش‌های قبلی در سایر انواع خزندگان گزارش شده بود (۴). مشاهده گردید. تغییرات پاتولوژیک و روشهای غربالگری وجود RNA ویروسی خاص را در ضایعات دیده شده در بافتهای متعدد را نشان داد. تولید ترشحات موکوسی، تراکئیت، ازوفازیت، التهاب کبد، درگیری سیستم عروقی و اسپکتاکولیت جزو یافته‌های مشخص این مطالعه بود اما چون در بسیاری از عفونتهای دیگر سیستم تنفسی نیز ممکن است علائم مشابهی مشاهده شود، لذا بررسی ویژگی‌های بالینی و بافت‌شناسی برای تشخیص افتراقی عفونت نیدوویروس در ایگواناها می‌تواند بسیار مفید باشد. با این حال، همپوشانی نتایج حاصل از بررسی ضایعات بالینی و بافت شناسی این بیماری و مقایسه آن با نتایج حاصل از بررسی سایر عوامل ویروسی (مانند دیسترس تنفسی، بی‌اشتهایی و ذات‌الریه پیش‌رونده) می‌تواند توسعه یک آزمایش PCR مالتی پلکس را برای غربالگری چندین ویروس تنفسی خزندگان تضمین کند. آنتی ژن ویروسی در مخاط حفره دهان و بینی، نای و مری ایگوانا شناسایی شد که نشان دهنده تروپیسیم و گرایش این ویروس به سلول‌های اپیتلیال، به ویژه سلول‌های مژک دار دستگاه تنفسی و نیز قسمتهای فوقانی مری، کلیه، پانکراس،

نیدوویرالها، مانند کروناویروس‌های گربه سانان (Feline Corona Viruses (FCoV)، کروناویروس سیستمیک راسوها (Ferret Systemic Coronavirus (FRSCV) و کرونا ویروس سندرم حاد تنفسی (SARS-CoV) شناخته شده است. در مورد کرونا ویروس گربه سانان، توانایی آلوده کردن، تکثیر و فعال کردن مونوسیت‌ها و ماکروفاژها توسط این ویروس در پاتوژنز پریتونیت عفونی گربه سانان که یک بیماری کشنده عفونی و سیستمیک است ضروری می‌باشد. در حالی که بیوتیپ کروناویروس روده‌ای گربه با حدت کم (Feline Enteric Coronavirus (FECV) عمدتاً در انتروسیت‌ها تکثیر می‌شود و فقط باعث ایجاد بیماری خفیف روده می‌شود. بیوتیپ ویروس پریتونیت عفونی گربه بسیار بدخیم (Feline Infectious Peritonitis Virus (FIPV) عمدتاً پس از جهش‌های ژن S در کروناویروس روده‌ای گربه با حدت کم و در بدن میزبان آلوده ایجاد می‌شود که امکان تکثیر کارآمد و انتشار سیستمیک همراه با مونوسیت‌ها را فراهم می‌کند (۲۶). این امر باعث انتشار سریع ویروس در سراسر بدن می‌شود (ویرمی مرتبط با مونوسیت) و پیش نیاز فعال شدن مونوسیت در طی فاز توسعه‌ای بعدی فلبیت گرانولوماتوزی (Granulomatous Phlebitis) است که مشخصه پریتونیت عفونی گربه سانان است (۲۷). مکانیسم مشابهی برای راسوها با بیماری مشابه و عفونت‌های تجربی موش‌های ناک اوت اینترفرون گاما (Interferon Gamma (IFN- γ) Knockout Mice) آلوده شده با ویروس هپاتیت موشی (Mouse Hepatitis Virus (MHV)) وجود دارد (۲۸). مشابه گربه‌های مبتلا به پریتونیت عفونی گربه سانان، ایگوانای مورد مطالعه نیز واسکولیت چند کانونی تحت سلطه ماکروفاژها را نشان داد که با نکروز فیبرینوئید دیواره عروق همراه بود و بصورت کاف‌های مزمن دور عروقی (پیو) گرانولوماتوزی و با بیان گسترده نیدوویروس همراه بود. این ضایعات عروقی

می‌تواند با تأثیر بر جذب کلی هوا، علاوه بر تأثیرات ریه بر تبادل مستقیم اکسیژن، در دستگاه تنفسی فوقانی نقش داشته باشد. نیدوویروس‌ها بخشی از گروه رو به گسترش توروویروس‌های مرتبط با بیماری‌های تنفسی هستند. یک ویروس مرتبط نیز در سقنقور دم‌کوتاه زبان‌آبی (Tiliqua rugose or shingleback lizard or bobtail lizard (Trachydosaurus rugosus)) مبتلا به بیماری تنفسی شناسایی شده است (۷). علائم بالینی در این مارمولک مشابه علائم مشاهده شده در این ایگوانا بود، از جمله وجود ترشحات مخاطی بیش از حد در حفره دهان و بی‌اشتهایی. علاوه بر این، یک نیدوویروس مرتبط با نشخوارکنندگان اهلی همراه با درگیری شدید نای و پنومونی شناسایی شده است (۱۹). یافته‌های بالینی مشابه در این حیوانات نشان می‌دهد که ویروس‌های موجود در این شاخه ممکن است گرایش‌های بافتی و مکانیسم‌های بیماری‌زایی را به اشتراک بگذارند. توالی‌های ویروسی مرتبط نیز در نماتودهای مرتبط با خزندگان و بخصوص مارها شناسایی شده‌اند، اگرچه هیچ اطلاعاتی فراتر از همین تعیین توالی در دسترس نیست (۲۵)؛ اما توجه به این نکته که این شاخه ویروسی شامل ویروس‌هایی با میزبان‌های متنوع اعم از خزندگان، پستانداران و بی‌مهرگان است، تنوع بالای خصوصیات آن را برجسته می‌کند و بر نیاز به تحقیقات بیشتر در مورد این مجموعه در حال گسترش از پاتوژن‌های بالقوه تأکید می‌کند. این واقعیت جالب توجه است که سرپنتوویروس‌ها می‌توانند سلول‌های غیراپیتلیال منتشر را نیز در کل بدن و به طور خاص سلول‌های اندوتلیال، مونوسیت‌های داخل عروقی و ماکروفاژهای خارج عروقی حاضر در فرآیندهای التهابی که با رویکرد ایمونوهیستولوژیک ما نشان داده شده است، آلوده کنند. یافته‌های این مطالعه به خوبی نشان می‌دهد که مونوسیت‌ها گسترش سیستمیک ویروس را تسهیل می‌کنند. عفونت‌های مونوسیت - ماکروفاژ به‌عنوان یک فرآیند کلیدی در پاتوژنز سایر اعضای راسته

8. Hoon-Hanks LL, Stöhr AC, Anderson AJ, Evans DE, Nevarez JG, Díaz RE, et al. Serpentovirus (nidovirus) and orthoreovirus coinfection in captive veiled chameleons (*Chamaeleo calyptratus*) with respiratory disease. *Viruses*. 2020;12(11):1329.
9. Marschang RE, Pasterny J, Seń J, Skomorucha Ł, Stanicki K. A novel iguanid herpesvirus detected in asymptomatic green iguanas (*Iguana iguana*) in Poland. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2021;52(2):815-9.
10. Dervas E, Hepojoki J, Laimbacher A, Romero-Palomo F, Jelinek C, Keller S, et al. Nidovirus-associated proliferative pneumonia in the green tree python (*Morelia viridis*). *Journal of virology*. 2017;91(21):e00718-17.
11. Martínez Silvestre A, Silveira L, Mateo J, Urioste J, Rodríguez Domínguez M, Pether J. Cloacal microbiology in threatened captive giant lizards from the Canary Islands (genus *Gallotia*). *Rev Esp Herp*. 2003;17:29-37.
12. Millichamp NJ. Ophthalmic disease in exotic species. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*. 2002;5(2):223-41.
13. Jacobson E, Adams H, Geisbert T, Tucker S, Hall B, Homer B. Pulmonary lesions in experimental ophidian paramyxovirus pneumonia of Aruba Island rattlesnakes, *Crotalus unicolor*. *Veterinary Pathology*. 1997;34(5):450-9.
14. Caswell JL, Williams KJ. Respiratory system. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 2*. 2016:465-591. e4.
15. Pastor L. The histology of the reptilian lungs. *Histology, Ultrastructure and Immunohistochemistry of Respiratory Organs in Non-Mammalian Vertebrates*. 1995:131-53.
16. Maestre AM, Garzon A, Rodriguez D. Equine torovirus (BEV) induces caspase-mediated apoptosis in infected cells. *PLoS One*. 2011;6(6):e20972.

می‌تواند ناشی از تعامل بین مونوسیت‌های فعال آلوده به نیدوویروس و سلول‌های اندوتلیال باشد. این سلول‌های اندوتلیال عفونی شده مسئول طیف وسیع ضایعات گرانولوماتوز تا فیبرینونکروز در سایر اندام‌ها نیز هست و تا حدی ماهیت ایسکمیک نیز دارند.

فهرست منابع

1. Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder EJ. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus research*. 2006;117(1):17-37.
2. Balasuriya U, Carossino M, Timoney P. Equine viral arteritis: A respiratory and reproductive disease of significant economic importance to the equine industry. *Equine Veterinary Education*. 2018;30(9):497-512.
3. Buchatsky LP, Makarov VV. Nidoviruses associated with aquatic animals. *Veterinary Science Today*. 2020:115-21.
4. Uccellini L, Ossiboff RJ, De Matos RE, Morrissey JK, Petrosov A, Navarrete-Macias I, et al. Identification of a novel nidovirus in an outbreak of fatal respiratory disease in ball pythons (*Python regius*). *Virology journal*. 2014;11(1):1-6.
5. Stenglein MD, Jacobson ER, Wozniak EJ, Wellehan JF, Kincaid A, Gordon M, et al. Ball python nidovirus: a candidate etiologic agent for severe respiratory disease in *Python regius*. *MBio*. 2014;5(5):e01484-14.
6. Zhang J, Finlaison DS, Frost MJ, Gestier S, Gu X, Hall J, et al. Identification of a novel nidovirus as a potential cause of large scale mortalities in the endangered Bellinger River snapping turtle (*Myuchelys georgesi*). *PLoS One*. 2018;13(10):e0205209.
7. O'Dea MA, Jackson B, Jackson C, Xavier P, Warren K. Discovery and partial genomic characterisation of a novel nidovirus associated with respiratory disease in wild shingleback lizards (*Tiliqua rugosa*). *PloS one*. 2016;11(11):e0165209.

17. Koopmans M, Horzinek MC. The pathogenesis of torovirus infections in animals and humans. *The Coronaviridae*. 1995;403-13.
18. Kuwabara M, Wada K, Maeda Y, Miyazaki A, Tsunemitsu H. First isolation of cytopathogenic bovine torovirus in cell culture from a calf with diarrhea. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007;14(8):998-1004.
19. Tokarz R, Sameroff S, Hesse RA, Hause BM, Desai A, Jain K, et al. Discovery of a novel nidovirus in cattle with respiratory disease. *The Journal of general virology*. 2015;96(Pt 8):2188.
20. Ariel E. Viruses in reptiles. *Veterinary Research*. 2011;42(1):1-12.
21. Marschang R. Viruses infecting reptiles. *Viruses* 3: 2087–2126. 2011.
22. Penner J, Jacobson E, Brown D, Adams H, Besch-Williford C. A novel *Mycoplasma* sp. associated with proliferative tracheitis and pneumonia in a Burmese python (*Python molurus bivittatus*). *Journal of comparative pathology*. 1997;117(3):283-8.
23. Starck J, Weimer I, Aupperle H, Müller K, Marschang R, Kiefer I, et al. Morphological pulmonary diffusion capacity for oxygen of burmese pythons (*Python molurus*): a comparison of animals in healthy condition and with different pulmonary infections. *Journal of Comparative Pathology*. 2015;153(4):333-51.
24. de Macêdo IL, de Sousa DER, Hirano LQL, Name KPO, Báo SN, de Castro MB. Nasal Melanophoroma in a Captive Green Iguana (*Iguana Iguana*). *Topics in Companion Animal Medicine*. 2020;41:100463.
25. Shi M, Lin X-D, Tian J-H, Chen L-J, Chen X, Li C-X, et al. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*. 2016;540(7634):539-43.
26. Malbon A, Meli ML, Barker E, Davidson A, Tasker S, Kipar A. Inflammatory mediators in the mesenteric lymph nodes, site of a possible intermediate phase in the immune response to feline coronavirus and the pathogenesis of feline infectious peritonitis? *Journal of comparative pathology*. 2019;166:69-86.
27. Rottier PJ, Nakamura K, Schellen P, Volders H, Haijema BJ. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *Journal of virology*. 2005;79(22):14122-30.
28. Roth-Cross JK, Bender SJ, Weiss SR. Murine coronavirus mouse hepatitis virus is recognized by MDA5 and induces type I interferon in brain macrophages/microglia. *Journal of virology*. 2008;82(20):9829-38.

