



Examen de adenovirus con métodos moleculares y patológicos en casos de neumonía ovina

Muhammet Bahaeddin Dörtbudak^{1*} ; Yavuz Selim Sağlam² ;
Serkan Yıldırım² ; Mehmet Özkan Timurkan³ .

¹Bingol University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pathology, Bingol, Turkey.

²Atatürk University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pathology, Erzurum, Turkey.

³Atatürk University Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Virology, Erzurum, Turkey.

*Correspondencia: mbdortbudak@gmail.com

Recibido: Noviembre 2021; Aceptado: Julio 2022; Publicado: Julio 2022.

RESUMEN

Objetivo. Revelar adenovirus (AdV) que causan neumonía en ovejas y examinar cambios patológicos en los ganglios linfáticos pulmonares y mediastínicos de muestras positivas para adenovirus infectadas de forma natural. **Material y métodos.** Para este propósito, se examinaron macroscópicamente 1459 pulmones de ovejas sacrificadas en un matadero, y se detectaron lesiones de neumonía en 88 (6.03%) de estas. Las secciones de tejido parafinadas de estos especímenes con neumonía se examinaron con los métodos inmunohistoquímicos (IHC) e inmunofluorescencia indirecta (IF), mientras que tejidos homogeneizados se examinaron usando los métodos ELISA de antígeno y PCR para determinar la positividad de adenovirus. **Resultados.** Por consiguiente, la prevalencia de adenovirus se determinó como 19.3% para IHC, 22.7% para IF, 20.5% para ELISA y 13.6% para PCR. La tinción con hematoxilina-eosina (HE) se realizó para examinar los cambios histopatológicos en las muestras que estaban infectadas naturalmente con adenovirus. Los exámenes histopatológicos de las muestras de pulmón infectadas de forma natural revelaron mayormente neumonía intersticial, junto con hallazgos de neumonía catarral y verminosa. En consecuencia, se determinó que los métodos más eficaces en la detección de adenovirus en neumonías ovinas fueron encontrado respectivamente como IF, ELISA, IHC y PCR. El hallazgo de que los adenovirus solo se vio en los ganglios linfáticos mediastínicos de algunas muestras en los métodos inmunopatológicos sugirió latencia. **Conclusiones.** La presencia de adenovirus en casos de neumonía ovina se determinó por primera vez con los métodos de inmunofluorescencia indirecta, ELISA de antígenos y PCR. La posibilidad de la naturaleza latente de la infección por adenovirus en estas especies también se discutió por primera vez.

Palabra clave: Adenovirus; ELISA; histopatología; inmunopatología; PCR; ovino (*Fuentes: MeSH, DeCS*).

ABSTRACT

Objective. Reveal adenoviruses (AdV) that cause pneumonia in sheep and examine pathologic changes in the pulmonary and mediastinal lymph nodes of naturally infected adenovirus-positive specimens. **Material and methods.** For this purpose, 1459 lungs of sheep slaughtered in a slaughterhouse were macroscopically examined, and pneumonia lesions were detected in 88 (6.03%)

Como citar (Vancouver).

Bahaeddin DM, Selim Sağlam Y, Yıldırım S, Özkan Timurkan M. Examen de adenovirus con métodos moleculares y patológicos en casos de neumonía ovina. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(Supl):e2738. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2738>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

of these. The paraffinized tissue sections of these specimens with pneumonia were examined with the immunohistochemical (IHC) and indirect immunofluorescence (IF) methods, whereas their tissue homogenates were examined using the Antigen ELISA and PCR methods for adenovirus positivity. **Results.** Accordingly, the prevalence of adenoviruses was determined as 19.3% for IHC, 22.7% for IF, 20.5% for ELISA and 13.6% for PCR. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to examine histopathological changes in the specimens that were naturally infected with adenoviruses. The histopathological examinations of the naturally infected lung specimens revealed mainly interstitial pneumonia, as well as catarrhal and verminous pneumonia findings. Consequently, it was determined that the most effective methods in the detection of adenoviruses in sheep pneumonias were found respectively as IF, ELISA, IHC and PCR. The finding that adenoviruses were observed only in the mediastinal lymph nodes of some specimens in the immunopathological methods suggested that the latency. **Conclusions.** The presence of adenoviruses in sheep pneumonia cases was determined with the indirect immunofluorescence, antigen ELISA and PCR methods for the first time. The possibility of the latent nature of adenovirus infection in these species was also discussed for the first time.

Keywords: Adenovirus; ELISA; histopathology; immunopathology; PCR; sheep (Source: MeSH, DeCS).

INTRODUCCIÓN

Las neumonías ovinas se encuentran entre los problemas de salud más frecuentes de esta especie en todo el mundo causando dificultad respiratoria, pérdida de rendimiento y, a veces, la muerte. Por lo general, los agentes infecciosos como bacterias, virus y parásitos juegan un papel en el surgimiento de neumonías (1,2). Las causas virales que tienen un lugar significativo en la etiología de las neumonías ovinas llevan a daños en los epitelios del sistema respiratorio y el sistema mucociliar. Además, como también suprimen la inmunidad, no solo pueden causar principalmente infecciones respiratorias del sistema respiratorio, sino también causar la aparición de infecciones secundarias (3,4). Los adenovirus, que se encuentran entre las causas de neumonía viral de las ovejas, se encuentran en abundancia en el mundo. Los adenovirus con un diámetro de 70 a 90 nm, estructura de cápside icosaédrica, que contienen ADN de doble cadena lineal no envuelto pertenecen a la *Adenoviridae* familia y se examinan en 6 géneros. Estos son *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Siadenovirus*, *Atadenovirus* *Testadenovirus* y *Ictadenovirus*. Entre estos 6 géneros, los grupos importantes para los rumiantes son los *Mastadenovirus* y los *Atadenovirus*. Las especies de adenovirus bovino A,B,C y adenovirus ovino A,B,C se clasifican en el género *Mastadenovirus*, mientras que el adenovirus bovino D,E y el adenovirus ovino D se clasifican en el género *Atadenovirus*. (5). Los adenovirus por lo general crean infecciones subclínicas. Sin embargo, en los casos en que se observan los síntomas clínicos de la enfermedad, hay dificultad respiratoria, tos y secreción nasal acompañadas

de descondicionamiento. A pesar de que los corderos jóvenes son más susceptibles a la enfermedad, la mortalidad también se puede observar en adultos en casos de infecciones secundarias (6,7,8). El virus que se transmite por contacto directo, inhalación, descarga fecal-oral, nasal y lagrimal se une a los receptores de coxsackievirus y adenovirus (CAR) de las células epiteliales respiratorias y demuestra un efecto lítico sobre estas células (9,10). En las infecciones por adenovirus, los pulmones tienen un color pálido, así como una consistencia hinchada y elástica. El examen microscópico revela degeneración en los bronquios/bronquiolos, proliferación de pneumocitos de tipo II, infiltración de células mononucleares y síntomas de neumonía intersticial como hiperplasia linfocítica y fibromuscular. Además, estos agentes virales forman cuerpos de inclusión basófilos intranucleares en epitelios alveolares y bronquiales (6,8,11). La infección por adenovirus se diagnostica directamente mostrando la presencia del antígeno o indirectamente detectando los anticuerpos que se forman contra el antígeno. Se utilizan pruebas de cultivo celular, IF, IFAT, DFAT, IP, EM, PCR y ELISA para el diagnóstico directo de la causa. Para el diagnóstico indirecto se utilizan pruebas serológicas como SN, AGID, GF y ELISA (12,13,14,15).

La gran mayoría de los estudios que se han realizado sobre infecciones por adenovirus que causan neumonía en ovejas en todo el mundo son estudios de seroprevalencia, y casi no existen estudios sobre qué prevalencia de antígeno se ha determinado utilizando varios métodos juntos. En este estudio, se

identificaron adenovirus que causan neumonía en ovejas utilizando métodos moleculares y patológicos, y se realizó una comparación entre estos métodos. Además, se examinaron los cambios histopatológicos que se produjeron en muestras infectadas positivas de adenovirus.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales de animales. Este estudio se realizó con la aprobación del Comité de Ética Local de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Atatürk con la decisión 2018/71. Dentro del alcance del estudio, se examinaron macroscópicamente 1459 pulmones de oveja y la linfa mediastínica de estos pulmones, y se recogieron muestras de 88 pulmones de oveja que mostraban síntomas de neumonía y ganglios linfáticos de estos pulmones. Mientras que algunas de estas muestras de tejido se fijaron en una solución de formalina tamponada al 10% para exámenes histopatológicos (HE) e inmunopatológicos (IHC, IF), algunas se conservaron a -20°C para análisis de PCR y ELISA.

Examen Histopatológico. El procesamiento rutinario de tejidos se llevó a cabo sometiendo los tejidos fijados en la solución de formalina tamponada al 10% en las etapas de deshidratación, aclaramiento y parafinización. Después de la etapa de procesamiento de tejido, se obtuvieron secciones de 5 µm de espesor de todas las muestras que se incrustaron en bloques de parafina usando un micrótopo rotatorio (Leica RM 2235) y se tomaron en portaobjetos normales y recubiertos con adhesivo. Para los exámenes histopatológicos de las secciones tomadas en los portaobjetos normales, se realizó tinción con HE. Los preparados teñidos con HE se examinaron bajo un microscopio óptico (Leica DM 2500).

Tinción Inmunohistoquímica. Las secciones de tejido tomadas sobre los portaobjetos recubiertos con adhesivo se sometieron a desparafinación y deshidratación. Los tejidos se mantuvieron en H₂O₂ al 3% para la inactivación de la peroxidasa endógena. Para revelar la presencia de antígeno, los tejidos se hirvieron en un horno de microondas con una solución de recuperación de antígeno. Se goteó una solución de bloque de proteína sobre los tejidos para evitar la unión a antígeno no específico. Después de esto, los tejidos se incubaron en el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal de ratón anti-adenovirus tipo 3 (BAV3) (No.

de Catálogo: BIO 292, BIOX Jemelle, Bélgica) diluido con agua en una proporción de 1/50 a +4°C durante 16 horas. Se goteó una solución de bloque de proteína sobre los tejidos para evitar la unión a antígeno no específico. El anticuerpo primario diluido con agua en una proporción de 1/20 se goteó sobre los tejidos, y los tejidos se incubaron a 37°C durante 1 hora. La incubación de los tejidos se facilitó en primer lugar usando el anticuerpo secundario biotinilado y, a continuación, el conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Se goteó un cromógeno de 3-3'diaminobencidina (DAB) sobre las secciones para mostrar las reacciones en los tejidos, y después de la contratinción con hematoxilina de Mayer, los preparados se examinaron bajo un microscopio óptico (Leica DM 2500).

Tinción de Inmunofluorescencia. Como en el proceso de tinción inmunohistoquímica, se goteó anticuerpo inmunofluorescente diluido 1/20 (No. de Catálogo: IgG H&L cabra anticonejo (FITC)) sobre las secciones de tejido que se sometieron a los mismos procedimientos, incluida la incubación de anticuerpos primarios, y las secciones se dejaron durante 45 min. Después de esto, se goteó una solución de glicerol/agua destilada (1/9) sobre las secciones, las secciones se cubrieron con un portaobjetos cubierta y se examinaron al microscopio con un adaptador fluorescente (Zeiss Axio Scope A1).

ELISA de Antígeno. La homogeneización se aplicó a los tejidos que se mantuvieron a -20°C, y se llevó a cabo el protocolo del Kit ELISA de Antígeno de Adenovirus Bovino (ADV-Ag) (MyBioSource Catálogo# MBS2608731, Lote#32305765) para detectar la presencia de adenovirus en estas muestras. En nuestro estudio, la presencia de adenovirus se examinó por métodos moleculares y patológicos. Se eligió la prueba ELISA de antígeno en el estudio. En este modelo de ELISA, la base de la placa está recubierta de anticuerpos. Como la base de la placa está destinada a detectar Mastadenovirus y Atadenovirus, la prueba puede reconocer adenovirus ovinos. Finalmente, usando un lector de microplacas con un filtro de 450 nm, se leyeron las densidades ópticas de las muestras de tejido por espectrofotometría (Thermo Scientific, Multiskan GO, ABD).

PCR. En primer lugar, para detectar ADN en los tejidos homogeneizados, se realizó la extracción de ADN usando el protocolo PureLink Genomic DNA mini kit (No de Catálogo:

2024278, Invitrogen, ABD). Para detectar ADN de adenovirus en los especímenes cuyos ácidos nucleicos se aislaron, los pares de cebadores utilizados por Sibley et al (16) se tomaron como referencia. Los cebadores en la publicación seleccionada (16) son cebadores basados en PCR anidados que pueden reconocer tanto Mastadenovirus como Atadenovirus. Los cebadores usados en el estudio se comprobaron en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) y son capaces de detectar todas estas especies (Mástil y Atadenovirus). En base a los informes del mismo autor, se realizó el termociclado de la reacción de PCR. Se añadió una tinción de ADN a los productos de PCR obtenidos con esta reacción, los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y se obtuvieron imágenes de las bandas que pertenecían a los especímenes positivos usando un transiluminador UV.

RESULTADOS

Se detectaron lesiones de neumonía en 88 de los 1459 pulmones de oveja que se examinaron macroscópicamente. La tasa de positividad de adenovirus se encontró como 19.3% con IHC, 22.7% con IF, 20.4% con ELISA y 13.6% con PCR en muestras de neumonía. En nuestro estudio, el método de IF se identificó como el método más efectivo en el diagnóstico de adenovirus ovinos, y de acuerdo con este método, 20 especímenes se infectaron naturalmente con adenovirus. Los exámenes microscópicos de las muestras positivas para adenovirus revelaron que estas muestras tenían neumonía intersticial (n=12), broncopneumonía catarral (n=6) y neumonía verminosa (n=2).

Resultados Macroscópicos. Según los datos macroscópicos registrados mientras se recogían las muestras, se determinó que los pulmones que estaban infectados de forma natural con adenovirus eran generalmente voluminosos-edematosos, tenían una consistencia elástica, un color pálido, no estaban colapsados, tenían cicatrices y zonas atelectásicas ocasionales en la superficie dorsal (Figura 1A). Además de estos, algunos especímenes tenían una consistencia dura, zonas consolidadas de color rojo oscuro o quistes parásitos. Los ganglios linfáticos mediastínicos no mostraron ningún hallazgo patológico significativo en el examen macroscópico.

Resultados Histopatológicos. En los casos con neumonía intersticial con infección por adenovirus, se observó que los tabiques interalveolares estaban engrosados debido a la infiltración de células mononucleares y la proliferación de pneumocitos de tipo II, y se observó hiperplasia fibromuscular alrededor de los conductos alveolares y bronquiolos, así como hiperplasia linfoide bronquial/bronquiolar y perivascular (Figura 1B, C). En los especímenes positivos con broncopneumonía catarral, se observó que la luz bronquiolar estaba llena de un exudado que contenía leucocitos que eran en gran parte polimorfonucleares (Figura 1D). Se detectaron granulomas parásitos en los especímenes positivos con neumonía verminosa. Se detectó linfadenitis leve en algunos ganglios linfáticos mediastínicos (Figura 1E).

Resultados Inmunoquímicos. La positividad de adenovirus se detectó en el 19.3% (n=17) de las 88 muestras con neumonía que se examinaron con el método inmunoquímico. Se observaron adenovirus en los epitelios bronquial/ bronquiolar y alveolar, macrófagos, tejido linfoide peribronquial/peribronquiolar y células inflamatorias en los ganglios linfáticos mediastínicos. En las muestras con positividad pulmonar, también se determinó la presencia de antígeno en sus ganglios linfáticos mediastínicos (Figura 1F, G). Por otro lado, mientras que 3 muestras de pulmón no mostraron presencia de antígeno, se encontró positividad en sus ganglios linfáticos.

Resultados de Inmunofluorescencia. La positividad de adenovirus se detectó en el 22.7% (n=20) de las 88 muestras con neumonía que se examinaron con el método de tinción de inmunofluorescencia. Se observaron adenovirus en los epitelios bronquial/bronquiolar y alveolar, macrófagos, tejido linfoide peribronquial/peribronquiolar y células inflamatorias en los ganglios linfáticos mediastínicos (Figura 1H, I). Por otra parte, mientras que un total de 6 muestras, incluidas las del método inmunoquímico y las de este método, no mostraron presencia de antígeno en los pulmones, se encontró inmunopositividad en sus ganglios linfáticos.

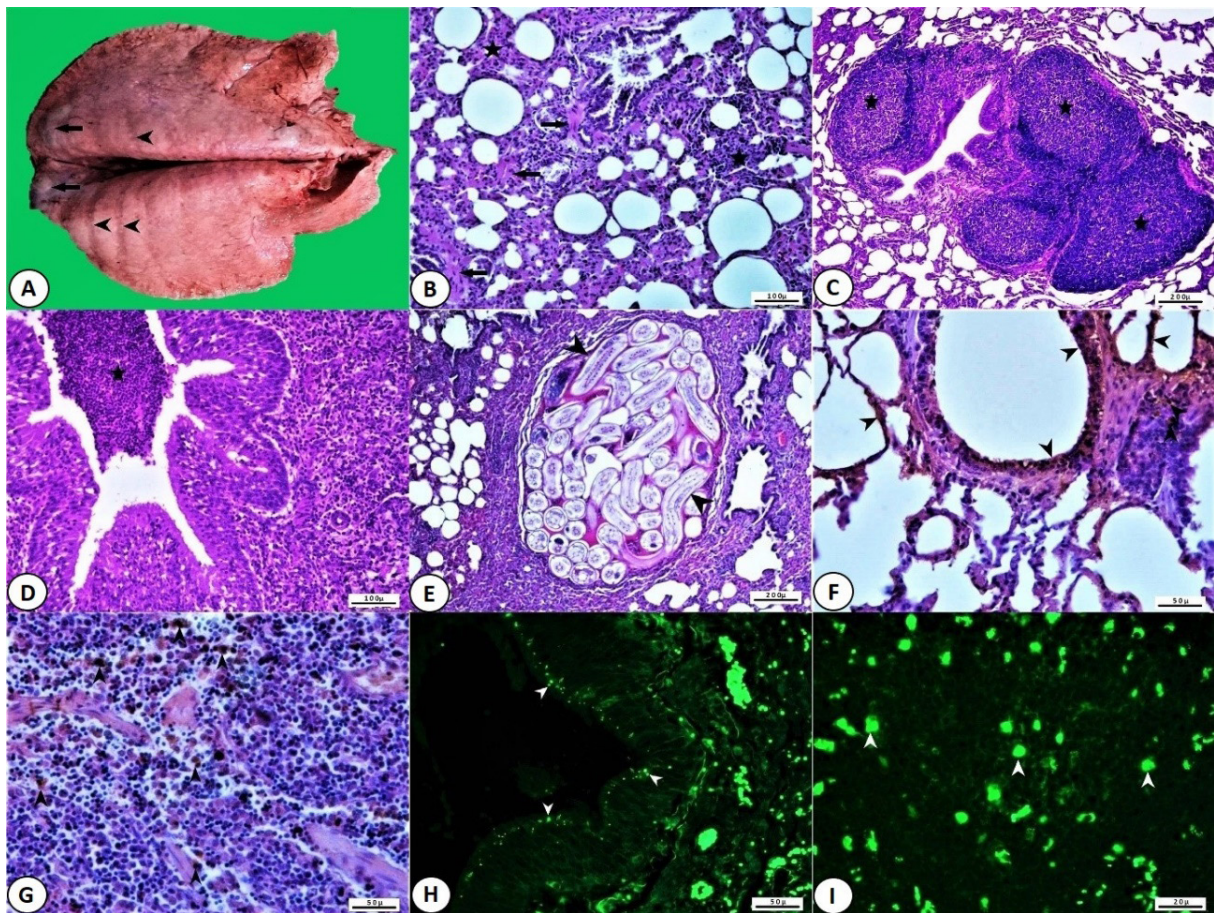


Figura 1. A; Rastros de inflamación (puntas de flecha) y enfisema (flechas) en el pulmón. B; Engrosamiento interalveolar (estrellas) e hipertrofia fibromuscular (flechas), HE, 100μ. C; Hiperplasia linfóide peribronquiolar (estrellas), HE, 200μ. D; Exudado catarral (estrella), conteniendo epitelio desprendido y células inflamatorias en la luz del bronquiolo, HE, 100μ. E; Formas de parásitos en granuloma quístico (puntas de flecha), HE, 200μ. F; Inmunorreacción AdV en bronquiolos y epitelios alveolares, IHC, 50μ. G; Inmunorreacción AdV en ganglio linfático mediastínico, IHC, 50μ. H; Inmunorreacción AdV en epitelio bronquial, IF, 50μ. I; Inmunorreacción AdV de ganglio linfático mediastínico, IF, 20μ.

Resultados de ELISA. La positividad de adenovirus se detectó en el 20.4% (n=18) de las muestras que se examinaron con la prueba ELISA de antígeno.

Resultados de PCR. Se encontraron bandas positivas (600 pb) que muestran la presencia de material genético perteneciente a adenovirus en el 13.6% (n=12) de las muestras examinadas con el método de PCR. Los resultados en los tipos de neumonía y métodos de examen de las muestras de pulmón positivas con adenovirus se muestran en las tablas (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de neumonía y métodos de examen de las muestras AdV (+).

Método	AdV(+) total	Tipos de Neumonía		
		IP	CBP	VP
IHC	17	10	5	2
IF	20	12	6	2
ELISA	18	11	5	2
PCR	13	8	4	1

IP; Neumonía intersticial CBP; Broncopneumonía catarral, VP; Neumonía verminosa

DISCUSIÓN

Los casos de neumonía ovina causada por adenovirus no son graves en adultos, pero por lo general resultan en pérdida de rendimiento, mientras que los de los corderos pueden resultar en muerte. Las causas de estos casos que provocan daño al sistema mucociliar e inactivación fagocítica también conducen a la aparición de infecciones secundarias (2,8,17). Los estudios que han implicado infecciones por adenovirus inducidas experimentalmente en ovejas han informado que los pulmones no están colapsados, tienen un color pálido y una consistencia elástica. En hallazgos microscópicos, se han mostrado cambios necróticos en el epitelio de las vías respiratorias, engrosamiento en el tabique interalveolar, infiltración de células mononucleares, casos de hiperplasia fibromuscular y linfoide (6,11,18). De acuerdo con los estudios experimentales, este estudio también demostró más hallazgos de neumonía intersticial en infecciones por adenovirus, pero la positividad por adenovirus también se encontró en los casos de neumonía catarral y verminosa. En adición, en este estudio, no se observaron cuerpos de inclusión como los de algunas infecciones inducidas experimentalmente (18,19).

La mayoría de los estudios sobre la prevalencia de adenovirus que causan neumonía en ovejas son serológicos, aunque los que se basan en la determinación de antígenos son muy pocos. Çeribaşı et al (20) determinó antígenos de adenovirus en 5.1% de pulmones de oveja con el método IP. Jamshidi et al (21) informó una prevalencia de adenovirus del 13.6% en pulmones de cabra con el método IHC. En este estudio, se determinó la positividad de adenovirus (muestras con virus en uno o ambos ganglios linfáticos pulmonares y mediastínicos se consideraron infectadas.) en el 19,3% de los pulmones de oveja con el método IHC. Estudios previos no han examinado los ganglios linfáticos mediastínicos en términos de positividad a adenovirus. En 3 muestras de pulmón en este estudio, aunque no se detectaron antígenos en los pulmones, los antígenos estaban presentes en los ganglios linfáticos mediastínicos de estas muestras de pulmón. Aunque se conocen los efectos líticos, latentes y oncogénicos de los adenovirus en otras especies, no se informaron sus efectos latentes y oncogénicos en ovejas (7,11,18). En este estudio, los resultados indican que el agente viral puede mostrar latencia en los ganglios linfáticos mediastínicos de estas

especies. En la bibliografía no se encontró ningún estudio que mostrara antígenos de adenovirus en muestras de tejido parafinizado de pulmones de oveja usando el método de IF indirecto. Sin embargo, Çeribaşı et al (20) detectaron la presencia de adenovirus en el 9.4% de los pulmones de oveja usando muestras de tejido congeladas con el método DFAT (la prueba de anticuerpos fluorescentes directos). Con el método de tinción de inmunofluorescencia que se usó en este estudio, se determinó que la presencia de antígeno era del 22.7%. Adicionalmente, en este método, como en el método de tinción inmunohistoquímica, algunas muestras mostraron presencia de antígeno solo en sus ganglios linfáticos. Çeribaşı et al (20) declaró que detectaron la presencia de adenovirus en más muestras de pulmón de oveja con el método DFAT que con el método IP. Asimismo, en este estudio, se encontró presencia de antígeno en más muestras con el método de IF que con el método de tinción de IHC. La detección de positividad también fue más selectiva en el método de IF que la tinción con IHC. Sin embargo, este estudio también señaló algunas desventajas del método de IF, tales como el hecho de que no ofrece tantos detalles morfológicos como la tinción con IHC, y permite una ventana de trabajo limitada debido a la pérdida de intensidad.

Entre los estudios previos, no se encontró ningún estudio que determinara la prevalencia de antígenos con el método ELISA en homogeneizados de tejidos de pulmones de oveja. Sin embargo, se han llevado a cabo varios estudios en diferentes partes del mundo para la detección de anticuerpos en muestras de suero de oveja utilizando el método ELISA y, en consecuencia, la seroprevalencia de adenovirus varía en el intervalo de 69-100% (22,23,24). En este estudio en el que se investigó la presencia de antígeno en homogeneizados de tejidos usando el método ELISA, se detectó positividad de adenovirus en el 20.4% de las muestras examinadas. Se pensó que el valor de prevalencia mucho más bajo en este estudio en comparación con los resultados de estudios anteriores se originó por el hecho de que en este estudio se examinó la presencia de antígenos, en lugar de la presencia de anticuerpos. Esto es debido a que los niveles de anticuerpos son altos incluso después de un tiempo después de infecciones virales (12,17). Entre los métodos que usaron en su estudio para investigar la prevalencia de virus del herpes en pulmones bovinos con

pneumonía, Çomaklı et al (25) informó que la prevalencia más alta se encontró con el método IF, que fue seguido respectivamente por IHC y ELISA. En este estudio, los métodos IF, ELISA e IHC proporcionaron valores de prevalencia de antígenos en orden descendente. Esta diferencia puede haber estado asociada con diferencias en virus y especies animales.

La revisión de la literatura en este estudio no reveló ningún estudio previo que examinara la presencia de adenovirus en casos de neumonía ovina mediante PCR. Pese a que la PCR es un método de diagnóstico molecular que se usa en el diagnóstico de muchas causas infecciosas con alta fiabilidad, se encontró que su tasa de detección de adenovirus era menor que la de los otros métodos de este estudio. Si bien se realizó un diagnóstico basado en la unión antígeno-anticuerpo en los otros métodos (IHC, IF, ELISA) que se utilizaron en este estudio, el método de PCR implica la identificación con genes de hexón y fibra específicos de virus (13,26). Después de la replicación de los adenovirus, solo el 10-15% obtiene una forma de una partícula de virus completa (27,28). Además, se informó de que 10^4 hasta 10^5 las partículas de virus se forman en una célula que está infectada con adenovirus, y solo el 1-5% de estas tienen la morfología y la capacidad de formar patogenicidad (29,30). En vista de esta información, se consideró que no todos los antígenos de adenovirus que se replican en el organismo huésped toman una forma de virus completa, y aunque estas partículas de adenovirus (procápsida) pueden proporcionar resultados positivos formando un complejo con anticuerpos, las cápsidas vacías que no portan los materiales genéticos específicos de hexón o fibra podrían no mostrar positividad en la PCR.

Además, los resultados también pueden diferir según el tipo de material utilizado en el método de PCR (31).

En conclusión, en la investigación de la presencia de antígenos, se observó que la prevalencia de adenovirus en ovejas era alta. En este estudio, en el que se utilizaron diferentes métodos de diagnóstico, se identificó el método de IF como el método más eficaz en el diagnóstico de adenovirus ovino, y su eficacia fue seguida respectivamente por ELISA, IHC y PCR. El principal hallazgo entre los que se consideraron destacados en este estudio fue la posibilidad de infecciones latentes por adenovirus en los ganglios linfáticos mediastínicos y que el método de PCR que se utiliza con éxito en el diagnóstico de muchos agentes infecciosos se encontró débil al determinar estos agentes. Además, en contraste con los resultados de los estudios experimentales, este estudio reveló infecciones en casos de neumonía catarral y verminosa, aparte de casos de neumonía intersticial.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Agradecimientos

El proyecto fue apoyado por el Consejo de Investigación Científica de la Universidad de Atatürk (número de proyecto: 2019-7408). Este estudio se derivó de una tesis (ID: 650498), que fue realizada por Muhammet Bahaeddin DÖRTBUDAK.

REFERENCIAS

1. Saleh NS, Allam TS. Pneumonia in sheep: bacteriological and clinicopathological studies. *Am J Res Commun.* 2014; 2(11):70-88. http://www.usa-journals.com/wp-content/uploads/2014/10/Saleh_Vol211.pdf
2. McRae KM, Baird HJ, Dodds KG, Bixley MJ, Clarke SM. Incidence and heritability of ovine pneumonia, and the relationship with production traits in New Zealand sheep. *Small Rumin Res.* 2016; 145:136-141. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.11.003>

3. Watkiss ER. Pathogenesis of respiratory syncytial virus. *Curr Opin Virol.* 2012; 2(3):300-305. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.01.008>
4. Benavides J, González L, Dagleish M, Pérez V. Diagnostic pathology in microbial diseases of sheep or goats. *Vet Microbiol.* 2015; 181(1-2):15-26. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.012>
5. Benkő M, Aoki K, Arnberg N, Davison AJ, Echavarría M, Hess M, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Adenoviridae 2022. *J Gen Virol.* 2022; 103(3):001721. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001721>
6. Debey BM, Lehmkuhl HD, Chard-Bergstrom C, Hobbs LA. Ovine adenovirus serotype 7-associated mortality in lambs in the United States. *Vet Pathol.* 2001; 38(6):644-648. <https://doi.org/10.1354/vp.38-6-644>
7. Rahal A, Ahmad AH, Prakash A, Mandil R, Kumar AT. Environmental attributes to respiratory diseases of small ruminants. *Vet Med Int.* 2014; 2014:1-10. <https://doi.org/10.1155/2014/853627>
8. Kumar MA, Kumar R, Varshney KC, Nair MG, Lakkawar AW, Sridhar BG, Palanivelu, M. Pathomorphological studies of lung lesions in sheep. *Indian J Vet Pathol.* 2014; 38(2):75-81. <https://doi.org/10.5958/0973-970X.2014.01142.0>
9. Giberson AN, Davidson AR, Parks RJ. Chromatin structure of adenovirus DNA throughout infection. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(6):2369-2376. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1076>
10. Greber UF, Flatt JW. Adenovirus entry: from infection to immunity. *Annu Rev Virol.* 2019; 6:177-197. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015550>
11. Andres CJ, Angelica ÁM, David CJ. Enfermedades respiratorias de vías aéreas bajas en ovinos, impacto regional, principales etiologías infecciosas y métodos de diagnóstico. *Rev Zooc.* 2016; 3(1):25-32. <https://revistas.udca.edu.co/index.php/zoociencia/article/view/522>
12. Matthes-Martin S, Boztug H, Lion T. Diagnosis and treatment of adenovirus infection in immunocompromised patients. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013; 11(10):1017-1028. <https://doi.org/10.1586/14787210.2013.836964>
13. Huang HS, Tsai CL, Chang J, Hsu TC, Lin S, Lee CC. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24(10):1055-1063. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.018>
14. Chakraborty S, Kumar A, Tiwari R, Rahal A, Malik Y, Dhama K, et al. Advances in diagnosis of respiratory diseases of small ruminants. *Vet Med Int.* 2014; 2014:1-16. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/508304>
15. Abd El-Ghany WA. A Comprehensive Review on Adenoviruses Infections in Fowl: Epidemiology, Forms, Diagnosis, and Control. *J World's Poult Res.* 2021; 11(2):151-167. <https://dx.doi.org/10.36380/jwpr.2021.19>
16. Sibley SD, Goldberg TL, Pedersen JA. Detection of known and novel adenoviruses in cattle wastes via broad-spectrum primers. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(14):5001-5008. <https://doi.org/10.1128/AEM.00625-11>
17. Minakshi P, Ranjan K, Brar B, Ambawat S, Shafiq M, Alisha A, et al. New approaches for diagnosis of viral diseases in animals. *Adv Anim Vet Sci.* 2014; 2(4S):55-63. <http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2014/2.4s.55.63>
18. Davies DH, Dungworth DL, Mariassy AT. Experimental adenovirus infection of lambs. *Vet Microbiol.* 1981; 6(2):113-128. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(81\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0378-1135(81)90004-3)
19. Sharp JM, Rushton B, Rimer RD. Experimental infection of specific pathogen-free lambs with ovine adenovirus type 4. *J Comp Pathol.* 1976; 86(4):621-628. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(76\)90071-2](https://doi.org/10.1016/0021-9975(76)90071-2)

20. Çeribasi AO, Çeribasi S, Ozkaraca M. Immunohistochemical detection of bovine herpesvirus type 1 and bovine adenovirus type 3 antigens in frozen and paraffinized lung sections of pneumonic sheep and goats. *Vet Arh.* 2016; 86(1):9-21. <http://www.vef.hr/vetarhiv/papers/2016-86-1-2.pdf>
21. Jamshidi K, Ozmen O, Rahmani M, Marvaki R, Soltanmohammadi M. Adenovirus Antigen Detection in Paraffinized Lung Sections of Pneumonic Goat Lungs Using Immunohistochemistry. *IranJVetRes.* 2019; 13(2):143-150. <https://doi.org/10.22059/IJVM.2019.262877.1004913>
22. Borujeni MP, Hajikolaei MRH, Shapouri MRSA, Roshani F. The role of sheep in the epidemiology of Bovine alphaherpesvirus 1 (BoHV-1). *Prev Vet Med.* 2020; 174:104818. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104818>
23. Alpay G, Öner EB, Yeşilbağ K. Seroepidemiology and molecular investigation of pestiviruses among sheep and goats in Northwest Anatolia. *Turk J Vet Anim Sci.* 2018; 42(3):205-210. <https://doi.org/10.1007/s11250-008-9225-3>
24. Alpay G, Tuncer P, Yeşilbağ K. Serological distribution of some viral infections in cattle, sheep and goats in an isolated island-ecosystem. *Ankara Univ Vet Fak Derg.* 2014; 61(1):43-48. https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000002603
25. Comakli S, Sağlam YS, Timurkan MÖ. Comparative detection of bovine herpesvirus-1 using antigen ELISA, immunohistochemistry and immunofluorescence methods in cattle with pneumonia. *Turkish J Vet Anim Sci.* 2019; 43(3):306-313. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/734737>
26. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of next-generation sequencing technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018; 122(1):e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
27. Hoeben RC, Uil TG. Adenovirus DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5(3):a013003. <https://cshperspectives.cshlp.org/content/5/3/a013003>
28. González-López JJ, Morcillo-Laiz R, Muñoz-Negrete FJ. Adenoviral keratoconjunctivitis: an update. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2013; 88(3):108-115. <https://doi.org/10.1016/j.oftale.2012.07.002>
29. Kundu A, McBride G, Wuertz S. Adenovirus-associated health risks for recreational activities in a multi-use coastal watershed based on site-specific quantitative microbial risk assessment. *Water Res.* 2013; 47(16):6309-6325. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.002>
30. Palomino-Tapia V, Mitevski D, Inglis T, Van der Meer F, Abdul-Careem MF. Molecular Characterization of Hemorrhagic Enteritis Virus (HEV) Obtained from Clinical Samples in Western Canada 2017–2018. *Viruses.* 2020; 12(9):941. <https://doi.org/10.3390/v12090941>
31. Wang H, Zheng Y, Deng J, Chen X, Liu P, Li X. Molecular epidemiology of respiratory adenovirus detection in hospitalized children in Shenzhen, China. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(9):15011. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4658874>