



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL ADENOVIRUS AVIAR EN POLLOS COMERCIALES DEL ECUADOR

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FOWL ADENOVIRUS IN COMMERCIAL CHICKEN FLOCKS IN ECUADOR

David Isaías De la Torre Duque^{1,2*}; Eulalia Cristina Mafla Quezada¹;
Byron Humberto Puga Torres²; Antonio José Piantino Ferreira¹

¹*Departamento de Patología Experimental y Comparada, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de São Paulo, CEP 05508-270, São Paulo, Brasil.*

²*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador. Jerónimo Leiton S/N y Gato Sobral. Quito, Ecuador.*

*Autor para correspondencia: daviddelatorreduque@gmail.com

Manuscrito enviado el 25 de mayo de 2018. Aceptado, tras revisión el 19 de julio de 2018. Publicado el 1 de septiembre de 2018.

Resumen

El Adenovirus Aviar del grupo I (FAdV-I), es considerado un patógeno de mucha importancia en la industria avícola en el Ecuador y a nivel mundial. La Hepatitis por Cuerpos de Inclusión (IBH) y el Síndrome del Hidropericardio (HPS), son las principales enfermedades asociadas a este virus. A pesar de ser un agente etiológico que por lo general se encuentra relacionado a enfermedades inmunodepresoras como la Anemia Infecciosa de las Aves o la enfermedad de Gumboro, recientes estudios han demostrado la actividad patológica del FAdV-I como responsable primario de estas enfermedades. Desde la década de 1990, se reportaron varios brotes importantes de IBH y HPS en muchos países de América Latina incluyendo el Ecuador, logrando identificar principalmente al serotipo 4 del FAdV-I como agente causal de estos brotes. El objetivo de este estudio fue caracterizar por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación de primera generación, los serotipos del FAdV-I que se encuentran circulando en granjas de aves comerciales en el Ecuador. Para esto fueron colectados órganos de pollos de engorde con problemas entéricos de 13 diferentes granjas a lo largo de la zona norte del Ecuador, y posteriormente fueron impregnados en tarjetas FTA para su transporte y procesamiento. 4/13 (30,8%) muestras fueron positivas a FAdV-I y mediante el secuenciamiento y análisis bioinformático del ADN amplificado por la PCR, se caracterizaron los serotipos 6 y 11 del FAdV-I. Estos datos demuestran la variedad de serotipos del FAdV-I presentes actualmente en granjas avícolas del Ecuador que podrían estar influenciando en el estado sanitario de la industria avícola del país.

Palabras clave: Adenovirus Aviar, Hepatitis por Cuerpos de Inclusión, Síndrome del Hidropericardio

Abstract

Fowl Adenovirus Group I (FAdV-I) is considered an important pathogen in the poultry industry in Ecuador and worldwide. Inclusion Body Hepatitis (IBH) and Hydropericardium Syndrome (HPS) are the main diseases associated with this virus. Despite being an etiological agent that is usually related to immunosuppressive diseases such as Chicken Anemia Virus or Gumboro disease, recent studies have demonstrated the pathological activity of FAdV-I as the primary responsible for certain diseases. Since the 1990s, several outbreaks of IBH and HPS have been reported in many Latin American countries including Ecuador, identifying the serotype 4 of FAdV-I as the causal agent of these outbreaks. The aim of this study was to characterize by the Polymerase Chain Reaction (PCR) and first-generation sequencing, the FAdV-I serotypes circulating in commercial poultry farms in Ecuador. Several organs of broilers with enteric problems were collected from 13 farms in the northern area of Ecuador, and subsequently impregnated in FTA cards for transport and processing. 4/13 (30.8%) samples were positive for FAdV-I, and by sequencing and bioinformatic analysis of DNA amplified by PCR, serotypes 6 and 11 of FAdV-I were characterized. These data show us the variety of serotypes circulating in poultry farms in Ecuador that could be influencing the health status of the country's poultry industry.

Keywords: Fowl Adenovirus, Inclusion body hepatitis, Hidropericardium syndrome

Forma sugerida de citar: De la Torre Duque, D. I., Mafla Quezada, E. C., Puga Torres, B. H., Piantino Ferreira, A. J. 2018. Caracterización molecular del adenovirus aviar en pollos comerciales del Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. Vol. 28(2):84-91. <http://doi.org/10.17163/lgr.n28.2018.06>.

1 Introducción

El adenovirus aviar (FAdV) es un virus clasificado dentro del género *Adenovirus* en la familia *Adenoviridae* (King *et al.*, 2012). Este género posee tres grupos clasificados como: FAdV-I (causante de HPS: Síndrome del Hidropericardio e IBH: Hepatitis por Cuerpos de Inclusión), FAdV-II (causante de HEV: Enteritis Hemorrágica del pavo) y FAdV-III (causante de EDS: Síndrome de Baja Postura) (Hess, 2000). El FAdV-I ha sido clasificado en 5 especies (A-E) y 12 serotipos (1–8a, 8b–11) (Adams *et al.*, 2017). La partícula viral tiene forma icosaédrica, carece de cápsula y tiene un diámetro de 70 a 90 nm. El genoma viral está formado por una cadena doble de ADN con un tamaño de 45 kb aproximadamente (Jiang *et al.*, 1999). El diseño de la cápsula viral consiste en la unión de 252 capsómeros, siendo 240 formados por la proteína Hexon y los 12 restantes por la proteína Penton. De cada vértice en donde se encuentra la proteína Penton, se desprenden dos fibras de diferente tamaño, las cuales están formadas de proteínas (proteínas de la fibra) que le otorgan la capacidad antigénica al virus (Adair y Fitzgerald, 2008).

El FAdV-I, ha sido asociado a dos principales enfermedades presentes en las aves comerciales, la Hepatitis por Cuerpos de Inclusión (IBH) que fue descrita por primera vez en el año de 1963 en Estados Unidos (Helmboldt y Frazier, 1963), y actualmente asociada a los 12 serotipos del FAdV-I, y el Síndrome del Hidropericardio (HPS) que es una enfermedad que afecta principalmente a pollos de engorde jóvenes de entre 3 y 6 semanas de edad, y que ha sido asociado al serotipo 4 del FAdV-I (Balamurugan y Kataria, 2004). En la actualidad el virus se encuentra distribuido alrededor del mundo (Alemnesh *et al.*, 2012), siendo responsable por producir disminución en el consumo de alimento, aumento en la conversión alimenticia y de la mortalidad, y aunque existe la asociación de la IBH e HPS con enfermedades inmunodepresoras como la Enfermedad Infecciosa de la Bursa (IBV) y la Anemia Infecciosa de las Aves (CAV), se ha detectado al FAdV-1 como agente primario en el desarrollo de IBH e HPS sin la presencia de otras enfermedades concomitantes (Sentíes-Cué *et al.*, 2010). Su forma de contagio es principalmente por vía oral, aunque la transmisión vertical es una forma importante de contagio debido a un sistema inmunológico poco desarrollado de la progenie (Toro *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2011).

Los brotes de Hepatitis por cuerpos de inclusión han sido reportados en varios países de América Latina como Brasil, Chile, Perú, Ecuador y México (Hess, 2000; Toro *et al.*, 2001). Mazaheri *et al.* (1998) reportaron la presencia del serotipo 4 del FAdV-I en el Ecuador, al ser aislado de tejidos hepáticos en aves con HPS y caracterizado por pruebas de neutralización y análisis por enzimas de restricción en el ADN viral (Toro *et al.*, 2000). Dada la distribución global de todos los serotipos de este virus es importante conocer la distribución geográfica de cada serotipo dentro de nuestro país, por lo que el objetivo de este estudio se centra en la caracterización molecular de los FAdV-I que circulan actualmente en las granjas de aves comerciales del Ecuador, para contar con el conocimiento científico que permita tomar decisiones y aplicar medidas sanitarias en beneficio de la industria avícola de la región.

2 Metodología

2.1 Muestras virales

Durante el año 2016 se colectaron muestras biológicas de diferentes granjas en la zona norte de la sierra ecuatoriana, cuyas aves presentaban sintomatología relacionada a hepatitis, mala absorción, aumento de la conversión alimenticia y aumento de la mortalidad. Las muestras colectadas fueron tomadas mediante la impronta en 13 tarjetas Whatman FTA (GE Healthcare Company, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) de órganos como riñones, tráqueas, bolsa de Fabricio, pulmones y tonsilas cecales de aves entre 4 y 7 semanas de edad, para luego ser transportadas hacia el laboratorio de Ornitopatología, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de São Paulo en Brasil, en donde fueron realizados los análisis moleculares respectivos. Cada tarjeta FTA estaba impregnada con 2 a 4 muestras de diferentes órganos y diferentes aves, que correspondían a 13 granjas distintas.

2.2 Maceración y extracción viral

El material fue procesado dentro de un flujo laminar, desinfectado con alcohol a 70° y exposición directa a luz ultravioleta (UVc) durante 15 minutos. Se recortó todo del material impregnado en cada tarjeta FTA para la obtención final de 13 muestras diferentes que se colocaron en microtubos de 2 ml con

PBS (Phosphate Buffered Saline), 0,1 M, pH 7,4 en proporción 1:1. La maceración se realizó con la utilización del Tissuelyser LT Bead Mill (Qiagen, Hilden, Germany) a 50 oscilaciones por segundo durante 5 minutos. El producto macerado fue centrifugado por 30 minutos a 12.000 x g y a 4°C (Koo *et al.*, 2013). Finalmente se colectó 200 µL del sobrenadante para el aislamiento del material genético.

2.3 Extracción del ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la extracción del material genético con fenol y cloroformo se utilizó la metodología descrita por Chomczynski (1993). Para la reacción de PCR fueron utilizados iniciadores diseñados por Meulemans *et al.* (2001), los cuales cubren parte de las regiones conservadas denominadas Pedestal 1 (P1) adyacentes a la región variable denominada Loop 1 (L1) en la secuencia de nucleótidos del gen Hexon, permitiendo amplificar los 12 diferentes serotipos del FAdV-I.

El mix de 25 µL para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) consistió de 1X de PCR buffer libre de Magnesio, 1,25 mM de cada desoxiribonucleótido trifosfato, 0,5 mM de cada iniciador, 1,25 U de Platinum® Taq polymerase (Invitrogen® by Life Technologies, Carlsbad, CA), y 2,5 µL de ADN extraído a una concentración aproximada de 1.000 ng/µL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 52°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto, finalizando con una extensión final de 72°C por 10 minutos. El producto final fue sometido a electroforesis utilizando gel de agarosa a una concentración de 1,5% para verificar la ampli-

ficación de fragmentos de ADN con un tamaño de aproximadamente 897 pb.

2.4 Purificación y secuenciamiento

El producto amplificado fue purificado utilizando el GPXTM PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, USA) según las instrucciones del fabricante. Cada producto purificado fue secuenciado en sentido senso y antisenso usando el BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems por Life Technologies, Carlsbad, California, EUA). Las reacciones finales fueron analizadas en un ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems por Life Technologies, Carlsbad, California, EUA).

2.5 Análisis filogenético

Las secuencias de nucleótidos fueron editadas usando el software CLC Main Workbench 7, y alineadas con el método CLUSTAL W disponible en el software Clustal X 2.0. El árbol filogenético fue inferido utilizando el método *Maximum Likelihood* basado en el modelo *Tamura 3-parameter* (Tamura, 1992), con 1000 repeticiones, disponible en el software Mega 7. Para esto fueron usadas las secuencias de nucleótidos generadas en este estudio y secuencias internacionales de los serotipos 6 y 11 del FAdV-I, tomadas del GeneBank (National Center for Biotechnology Information). Las secuencias de referencia para el alineamiento y construcción del árbol filogenético fueron tomadas de Brasil, México, Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Europa, Bélgica, China, Japón, Korea del Sur y la India, cuyos números de acceso se encuentran descritos en la Figura 1.

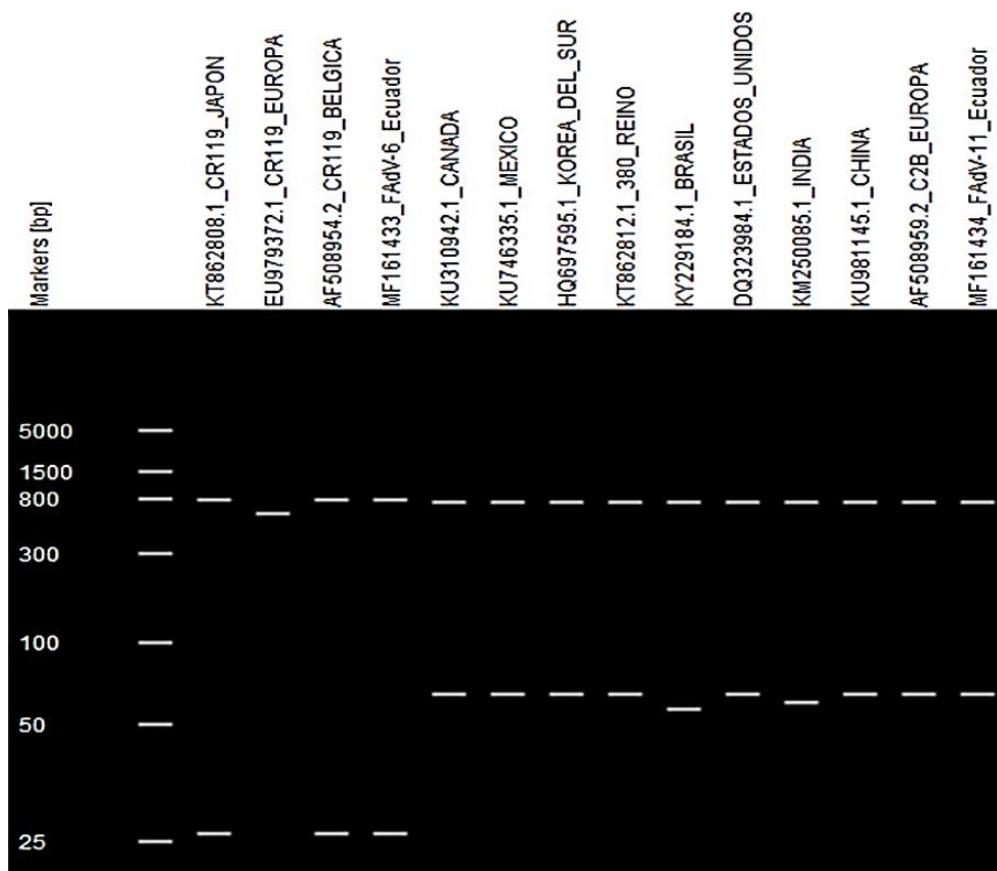


Figura 1. Gel virtual diseñado por el software CLC Main Workbench 7.8.1, después de la acción de enzimas de restricción PstI y EcoRI sobre las secuencias de los serotipos 6 y 11 del FAdV-I.

3 Resultados y Discusión

3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El producto final de la PCR para las 13 muestras fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, con un marcador de peso molecular de 100 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen™), encontrando 4/13 resultados positivos (30,8%), al mostrar las bandas a la altura aproximada de 897 pb, las cuales fueron analizadas para la caracterización del respectivo serotipo (Mettifogo *et al.*, 2014; Joubert *et al.*, 2014; De la Torre *et al.*, 2018). De acuerdo con Meulemans *et al.* (2001), el ADN amplificado mediante esta reacción puede incluir a los 12 serotipos de FAdV-I, sin poder determinar directamente el serotipo específico, a no ser que se utilicen enzimas de restricción para la obtención de bandas de ADN en gel de agarosa con tamaños específicos para cada

serotipo (Figura 2) (Meulemans *et al.*, 2001), o mediante el análisis de las secuencias de nucleótidos cuando son comparados con secuencias almacenadas en la base de datos del GeneBank. Mediante un análisis virtual sobre el uso de enzimas de restricción, se pudo determinar que el uso de la enzima PstI, provocó un corte del ADN en el sitio de reconocimiento (CTGCAG) de las secuencias de 808 pb de la cepa CR119 de Japón, Bélgica y USP-EC-01, dando como resultado dos bandas de 786 pb y 26 pb (Figura 2), a excepción de la cepa CR119 de Europa, que, por contar únicamente con 596 pb, no demostró regiones disponibles para la acción de cualquier enzima de restricción. Una enzima adicional EcoRI, realizó cortes del ADN en el sitio de reconocimiento (GAATTC) de las demás secuencias caracterizadas como serotipos 11 del FAdV-I, incluyendo la secuencia USP-EC-02, dando como resultado dos bandas de 746 pb y 63pb (Figura 2).

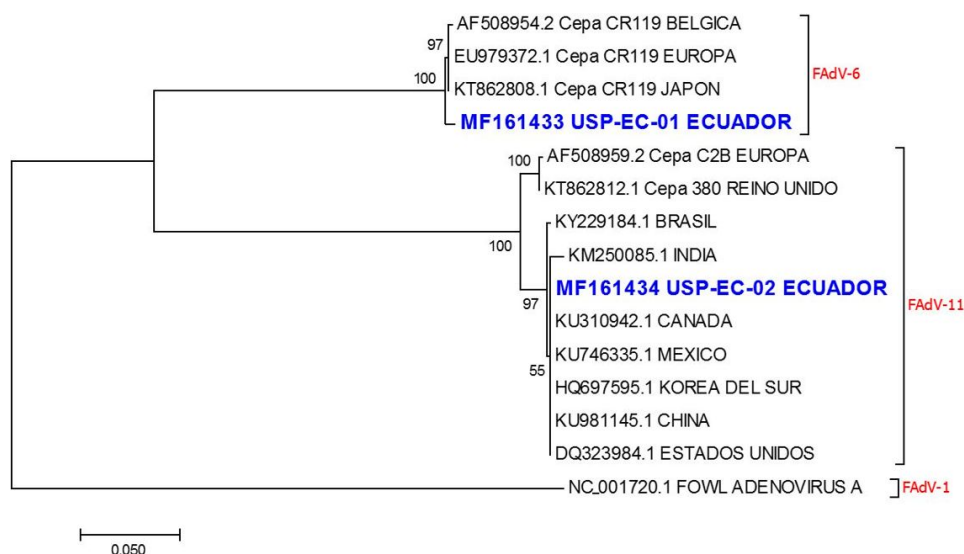


Figura 2. Árbol filogenético inferido usando el método Maximum Likelihood, basado en el modelo Tamura 3-parameter (Tamura, 1992). Las secuencias de las muestras de Ecuador están representadas en color azul y contienen su respectivo código de acceso en la base de datos del GeneBank. (FAdV=Adenovirus Aviar). La secuencia NC_001720.1 fue colocada como grupo externo.

3.2 Secuenciamiento

El secuenciamiento de los 4 productos positivos de la PCR dio lugar a la obtención de 2 diferentes secuencias y, siendo que tres muestras tuvieron secuencias exactamente iguales, se utilizó un consenso denominándolo USP-EC-02, y la secuencia de la cuarta muestra fue denominada USP-EC-01. Las secuencias obtenidas fueron ingresadas en la base de datos del GenBank con los códigos de acceso MF161433 para la secuencia USP-EC-01, y MF161434 para la secuencia USP-EC-02. De acuerdo a la matriz de identidad, las secuencias de nucleótidos (NT) y aminoácidos (AA) de USP-EC-01, tienen un alto porcentaje de identidad con las secuencias de las cepas CR119 del serotipo 6 del FAdV-I de Bélgica (99,1% de NT y AA), Europa y Japón (99,3% de NT y AA). Las secuencias de NT y AA de USP-EC-02 tienen un alto porcentaje de identidad con las secuencias del serotipo 11 del FAdV-I de México, Estados Unidos, Canadá, Korea del Sur y China (100% de NT y AA), Brasil (99% de NT y AA), India (98,3% de NT y AA), Reino Unido (97,5% de NT y AA), y Europa (97,3% de NT y AA).

3.3 Análisis filogenético

Los resultados del análisis filogenético se muestran en la Figura 2. Todas las secuencias analizadas fue-

ron agrupadas en dos grupos mayores que corresponden a los serotipos 6 y 11 del FAdV-I. La secuencia USP-EC-01, fue agrupada junto la cepa CR119 perteneciente al serotipo 6 del FAdV-I, registradas como originarias de Bélgica, Europa y Japón, demostrando la presencia de esta cepa viral en al menos los 3 continentes (Europa, Asia y América). La secuencia USP-EC-02, fue agrupada junto con secuencias de Europa, Reino Unido, Brasil, India, Canadá, México, Korea del Sur, China y Estados Unidos, las cuales han sido caracterizadas con el serotipo 11 del FAdV-I.

El FAdV-1 es responsable por causar dos principales enfermedades, la Hepatitis por Cuerpos de Inclusión (IBH) y el Síndrome del Hidropericardio (HPS) (Zhao *et al.*, 2015). Hay algunos casos en donde el virus ha sido aislado de aves sin signos de enfermedad, por lo que se requiere un mayor desarrollo de técnicas que permitan diferenciar cepas patogénicas y no patogénicas dentro del mismo serotipo del virus (Absalón *et al.*, 2017). En el Ecuador ya se ha reportado la presencia del serotipo 4 del FAdV-I como agente causal del Síndrome del Hidropericardio (Mazaheri *et al.*, 1998), pero también es importante recalcar que todos los serotipos están relacionados con la IBH (Adair y Fitzgerald, 2008), y de esta forma se debe mantener un control epidemiológico de todas las cepas y serotipos que circulan por

la región. 0 El serotipo 6 del FAdV-I pertenece a la especie E junto con los serotipos 7, 8a y 8b, pudiendo tener algún grado de protección cruzada con las vacunas contra el FAdV-I existentes en el Ecuador, que utilizan virus inactivados del serotipo 8, aunque esto no ha sido demostrado en ningún estudio experimental hasta el momento. Los serotipos 8b y 11 demostraron provocar lesiones en hígado a nivel macro y microscópico, luego de ser inoculados experimentalmente por vía ocular, y sin la presencia de virus inmunodepresores (Steer *et al.*, 2015), destacando que no existen desarrolladas vacunas específicas para el serotipo 11 que sean comercializadas en el Ecuador. Con estos resultados es importante considerar la necesidad del aislamiento y estudio experimental de los serotipos encontrados en el Ecuador con el objetivo de comprender la dinámica epidemiológica y la patogenicidad de todas las cepas de FAdV-I circulantes en el país.

4 Conclusiones

En este estudio se demostró la presencia de los serotipos 6 y 11 del Adenovirus Aviar, en lotes de aves comerciales del Ecuador. De esta forma se brinda un aporte a la comunidad científica para el desarrollo de nuevos estudios que permitan conocer la fisiopatología de las cepas circulantes y de ser necesario la creación de vacunas que ayuden a controlar la propagación y/o efecto negativo de estos virus sobre la producción avícola en las diferentes regiones del país.

Agradecimientos

Al laboratorio de Ornitopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de São Paulo, Brasil. El primer autor agradece el apoyo económico de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, SENESCYT, a través de su programa de becas "Universidades de Excelencia 2014".

Referencias

Absalón, Angel E, Andrés Morales-Garzón, Pedro F Vera-Hernández, Diana V Cortés-Espinosa, Sara M Uribe-Ochoa, Laura J García y Eduardo

Lucio-Decanini. 2017. "Complete genome sequence of a non-pathogenic strain of Fowl Adenovirus serotype 11: Minimal genomic differences between pathogenic and non-pathogenic viruses." *Virology* 501:63–69. Online: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.11.006>.

Adair, BM y Scott David Fitzgerald. 2008. "Group 1 adenovirus infections." *Diseases of poultry* 12:251–266. Online: <https://goo.gl/zhPW9U>.

Adams, Michael J, Elliot J Lefkowitz, Andrew MQ King, Balázs Harrach, Robert L Harrison, Nick J Knowles, Andrew M Kropinski, Mart Krupovic, Jens H Kuhn, Arcady R Mushegian *et al.* 2017. "50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects." *Archives of virology* 162(5):1441–1446. Online: <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3215-y>.

Alemnesh, W, M Hair-Bejo, I Aini y AR Omar. 2012. "Pathogenicity of fowl adenovirus in specific pathogen free chicken embryos." *Journal of comparative pathology* 146(2-3):223–229. Online: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.05.001>.

Balamurugan, V y JM Kataria. 2004. "The hydropericardium syndrome in poultry—a current scenario." *Veterinary research communications* 28(2):127–148. Online: <https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000012115.86894.1e>.

Chomczynski, Piotr. 1993. "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples." *Bio-techniques* 15(3):532–4. Online: <https://goo.gl/3uVgkW>.

De la Torre, David, Luis FN Nunez, Silvana H Santander Parra, Claudete S Astolfi-Ferreira y Antonio J Piantino Ferreira. 2018. "Molecular characterization of fowl adenovirus group I in commercial broiler chickens in Brazil." *VirusDisease* 29(1):83–88. Online: <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0430-z>.

Helmboldt, CF y MN Frazier. 1963. "Avian hepatic inclusion bodies of unknown significance." *Avian diseases* 7(4):446–450. Online: <https://doi.org/10.2307/1587881>.

Hess, M. 2000. "Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review." *Avian Pathology* 29(3):195–206. Online: <https://doi.org/10.1080/03079450050045440>.

- Jiang, Ping, Davor Ojkic, Tamas Tuboly, Paul Huber y Eva Nagy. 1999. "Application of the polymerase chain reaction to detect fowl adenoviruses." *Canadian Journal of Veterinary Research* 63(2):124. Online: <https://goo.gl/S1VWAL>.
- Joubert, Hilda W, Henry Aitchison, Louis H Maartens y Estelle H Venter. 2014. "Molecular differentiation and pathogenicity of Aviadenoviruses isolated during an outbreak of inclusion body hepatitis in South Africa." *Journal of the South African Veterinary Association* 85(1):01–08. Online: <https://doi.org/10.4102/jsava.v85i1.1058>.
- King, Andrew MQ, Michael J Adams, Eric B Carstens y Elliot J Lefkowitz. 2012. "Virus taxonomy." *Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* pp. 486–487. Online: <https://goo.gl/gTHZKs>.
- Koo, BS, HR Lee, EO Jeon, MS Han, KC Min, SB Lee y IP Mo. 2013. "Molecular survey of enteric viruses in commercial chicken farms in Korea with a history of enteritis." *Poultry science* 92(11):2876–2885. Online: <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03280>.
- Mazaheri, A, C Prusas, M Voss y M Hess. 1998. "Some strains of serotype 4 fowl adenoviruses cause inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in chickens." *Avian Pathology* 27(3):269–276. Online: <https://doi.org/10.1080/03079459808419335>.
- Mettifogo, Elena, Luis FN Nuñez, Silvana H Santander Parra, Claudete S Astolfi-Ferreira y Antonio J Piantino Ferreira. 2014. "Fowl adenovirus Group I as a causal agent of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome (IBH/HPS) outbreak in brazilian broiler flocks." *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(8):733–737. Online: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000800004>.
- Meulemans, G, M Boschmans, TP Van den Berg y M Decaesstecker. 2001. "Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses." *Avian Pathology* 30(6):655–660. Online: <https://doi.org/10.1080/03079450120092143>.
- Nakamura, Kikuyasu, Masaji Mase, Yu Yamamoto, Katsutoshi Takizawa, Masahiko Kabeya, Takashi Wakuda, Motohiro Matsuda, Takumi Chikuba, Yumiko Yamamoto, Takayuki Ohyama, Koji Takahashi, Naoto Sato, Noriko Akiyama, Hirokazu Honma y Kunitoshi Imai. 2011. "Inclusion Body Hepatitis Caused by Fowl Adenovirus in Broiler Chickens in Japan, 2009–2010." *Avian Diseases* 55(4):719–723. Online: <https://doi.org/10.1637/9813-052511-Case.1>.
- Senties-Cué, C Gabriel, Robert W Wills, Philip A Stayer, Mark A Burleson y Danny L Magee. 2010. "Epidemiology and effect on production parameters of an outbreak of inclusion body hepatitis in broilers." *Avian diseases* 54(1):74–78. Online: <https://doi.org/10.1637/8958-061109-Reg.1>.
- Steer, Penelope A, Jeanine R Sandy, Denise O'Rourke, Peter C Scott, Glenn F Browning y Amir H Noormohammadi. 2015. "Chronological analysis of gross and histological lesions induced by field strains of fowl adenovirus serotypes 1, 8b and 11 in one-day-old chickens." *Avian pathology* 44(2):106–113. Online: <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1007919>.
- Tamura, Koichiro. 1992. "Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases." *Molecular biology and evolution* 9(4):678–687. Online: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>.
- Toro, H, C Gonzalez, L Cerda, M Hess, E Reyes y C Geisse. 2000. "Chicken anemia virus and fowl adenoviruses: association to induce the inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome." *Avian diseases* pp. 51–58. Online: <https://doi.org/10.2307/1592507>.
- Toro, H, O Gonzalez, C Escobar, L Cerda, MA Morales y C Gonzalez. 2001. "Vertical induction of the inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome with fowl adenovirus and chicken anemia virus." *Avian diseases* pp. 215–222. Online: <https://doi.org/10.2307/1593031>.
- Zhao, Jing, QI Zhong, Ye Zhao, Yan-xin Hu y Guo-zhong Zhang. 2015. "Pathogenicity and complete genome characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens associated with inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in China." *PLoS One* 10(7):e0133073. Online: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133073>.