

**FACTORES ASOCIADOS A MORTALIDAD EMBRIONARIA EN POLLOS DE
ENGORDE, EN UNA EMPRESA DE SANTANDER, COLOMBIA**

ADRIANA ESPERANZA PEÑUELA SÁNCHEZ



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD – ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA
MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2017**

**FACTORES ASOCIADOS A MORTALIDAD EMBRIONARIA EN POLLOS DE
ENGORDE, EN UNA EMPRESA DE SANTANDER, COLOMBIA**

ADRIANA ESPERANZA PEÑUELA SÁNCHEZ

Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Epidemiología

Director

AURELIANO HERNÁNDEZ VÁSQUEZ

Médico Veterinario

Doctor en Medicina Veterinaria

Codirector

ALVARO JAVIER IDROVO VELANDIA

Doctor en Epidemiología

Asesor

JULIÁN FERNÁNDEZ NIÑO

Magíster en Salud Pública

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD – ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA
MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2017

DEDICATORIA

A mi esposo,
por su confianza y apoyo incondicional en el cumplimiento de mis metas

A mis papás y a mis hermanas,
porque desde la distancia siempre están conmigo

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la vida por estar aquí y ahora.

Al Dr. Aureliano Hernández, al Dr. Javier Idrovo y al Dr. Julian Fernández por guiarme en mi crecimiento académico y porque siempre pude contar con sus consejos cuando los necesité.

Al Dr. Luis Carlos Villamil y al Dr. Orbelín Soberanis por su contribución a la evaluación del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Alberto Botero, Al Dr. Leonardo Cotamo y al Dr. Oscar Díaz por permitirme acceder a los datos de la empresa y por el acompañamiento durante el trabajo en la incubadora.

A mi esposo, Camilo Medina, por su amor y protección.

A mi familia que siempre estará en mi corazón.

A la Dra. Myriam Ruiz, a los profesores y a mis compañeros de la maestría por acompañarme en este camino de crecimiento personal y profesional.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN.....	16
1. JUSTIFICACIÓN	26
2. HIPÓTESIS	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 GENERAL.....	29
3.2 ESPECÍFICOS	29
4. MARCO TEÓRICO.....	30
4.1 INCUBACIÓN.....	30
4.2 MORTALIDAD EMBRIONARIA	31
4.2.1 Etapas de la mortalidad embrionaria.....	31
4.2.1.1 Mortalidad embrionaria temprana (MET).....	31
4.2.1.2 Mortalidad embrionaria intermedia (MEI).	32
4.2.1.3 Mortalidad embrionaria tardía (METa).....	33
4.2.2 Factores que afectan la mortalidad embrionaria.....	33
4.2.2.1 Calidad del semen.....	33
4.2.2.2 Genética.	34
4.2.2.3 Teratogénesis.	35
4.2.2.4 Desarrollo del embrión en el momento de la ovoposición.....	36
4.2.2.5 Almacenamiento de huevos.	38
4.2.2.6 Temperatura.	41
4.2.2.7 Humedad relativa.	44
4.2.2.8 Oxígeno y dióxido de carbono.	45
4.2.2.9 Pérdida de agua del huevo.	47
4.2.2.10 Edad de la reproductora.	48

4.2.2.11 Nutrición de la reproductora.	49
4.2.2.12 Posición y volteo del huevo.	50
4.2.2.13 Malposición del embrión.	53
4.2.2.14 Contaminación microbiana.	55
4.3 ESTUDIOS ECOLÓGICOS.....	56
4.3.1 Niveles de medición.	56
4.3.2 Niveles de análisis.	57
4.3.3 Niveles de inferencia.	58
4.3.4 Tipos de diseño.	59
4.4.4.1 Según método de medición de la exposición.....	59
4.3.4.2 Según método de agrupación.....	59
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	61
5.2 POBLACIÓN	61
5.2.1 Población blanco.....	61
5.2.2 Población de estudio.	61
5.2.3 Unidad de análisis.....	63
6. METODOLOGÍA PARA ESTUDIO DE FACTORES DE RIESGO.....	65
6.1 CENSO.....	65
6.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	65
6.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	65
6.4 CAPTACIÓN Y SEGUIMIENTO.....	65
6.4.1 Manejo de las reproductoras.	65
6.4.2 Recolección de información.....	67
6.5 VARIABLES	68
6.5.1 Variable dependiente....	68
6.5.2 Variables independientes.	69
6.5.3 Variables del galpón y la granja.....	70
6.5.4 Variables del grupo de huevos en granja e incubación.....	70

6.6 ANÁLISIS	70
6.6.1 Procesamiento de la información.....	71
6.6.2 Análisis estadístico.....	71
7. RESULTADOS.....	75
8. DISCUSIÓN.....	87
9. METODOLOGÍA PARA DETERMINAR INCIDENCIA DE MORTALIDAD EMBRIONARIA EN CAMPO.....	100
9.1 MUESTREO.....	100
9.1.1 Tipo de muestreo.	100
9.1.2 Tamaño de muestra.....	100
9.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	101
9.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	101
9.4 CAPTACIÓN Y SEGUIMIENTO.....	102
9.4.1 Manejo de las reproductoras.....	102
9.4.2 Recolección de información.....	102
9.5 ANÁLISIS	103
9.5.1 Procesamiento de la información.....	103
9.5.2 Análisis estadístico.....	104
10. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	105
11. RESULTADOS.....	107
12. DISCUSIÓN.....	114
13. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	131
14. CONCLUSIONES.....	135
BIBLIOGRAFÍA.....	140
ANEXOS.....	161

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1: Consumo per cápita de carne de pollo en Colombia.....	18
Figura 2: Producción de pollo en Colombia	19
Figura 3: Mortalidad embrionaria en algunos lotes durante julio y agosto de 201524	
Figura 4: Posiciones al momento de la eclosión.....	54
Figura 5: Ubicación geográfica de los municipios donde hay presencia de granjas de la empresa y ubicación de la incubadora.....	63
Figura 6: Esquema general de una granja avícola	64
Figura 7: Desarrollo diario del embrión de pollo	69
Figura 8: Selección de embriones muertos detectados por ovoscopia	102
Figura 9: Huevo infértil comparado con huevo fértil	103

LISTA DE GRÁFICAS

pág.

Gráfica 1: Matriz de dispersión de algunos hallazgos relevantes para cada grupo de huevos respecto al porcentaje de mortalidad de cada etapa, observados en el embriodiagnóstico	80
Gráfica 2: Matriz de dispersión de algunas características productivas de las reproductoras (para el día de postura) respecto al porcentaje de mortalidad de cada etapa encontrado en el embriodiagnóstico.	81
Gráfica 3: Distribución del conteo de embriones muertos en cada etapa para cada grupo de huevos a los que se realizó embriodiagnóstico en las incubadoras, entre octubre de 2015 y abril de 2016 (n=819).	82
Gráfica 4: Número de embriones muertos en cada día de incubación	107
Gráfica 5: Incidencia acumulada de ME	108
Gráfica 6: Incidencia acumulada de ME para cada edad de las reproductoras ..	110

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1: Causas de fallas en la eclosión	21
Tabla 2: Parámetros (%) esperados para la estirpe Ross 308	23
Tabla 3: Características de procedencia y manejo de los grupos de huevos (observaciones en cada momento en un galón) a los que se realizó embriodiagnóstico en las incubadoras, entre octubre de 2015 y abril de 2016 (n=819).....	75
Tabla 4: Descripción de las características productivas de las reproductoras de cada galpón (para el día de postura de cada grupo de huevos evaluados) y hallazgos más relevantes de los embriodiagnósticos realizados en las incubadoras, entre octubre de 2015 y abril de 2016 (n=819).	78
Tabla 5: Modelo multinivel binomial negativo para evaluar la asociación entre mortalidad embrionaria temprana, intermedia, tardía y total y características productivas de las reproductoras, de manejo de los huevos y de hallazgos al embriodiagnóstico; con efectos aleatorios a nivel galpón y fijos en granja y lote (n=819).....	85
Tabla 6: Mortalidad embrionaria para estirpe Ross 308, según edad de las reproductoras.....	101
Tabla 7: Recuento de embriones muertos en cada día de incubación, para cada edad de las reproductoras	111
Tabla 8: Otros hallazgos observados en la ovoscopia y en el embriodiagnóstico	111
Tabla 9: Valores p de la prueba binomial	113

LISTA DE ANEXOS

pág.

Anexo A: Tabla de operacionalización de variables	161
Anexo B: Pruebas del supuesto de distribución de Poisson para cada etapa de la ME.....	171
Anexo C: Estimaciones del modelo nulo con efecto aleatorio para cada etapa de la ME.....	172
Anexo D: Análisis bivariado multinivel binomial negativo con efectos aleatorios en galpón para la mortalidad temprana, intermedia y tardía, de acuerdo características de los grupos de reproductoras para el día de postura, características de manejo de los huevos y hallazgos relevantes en el embriodiagnóstico para cada grupo (n=816)	173

RESUMEN

TÍTULO: FACTORES ASOCIADOS A MORTALIDAD EMBRIONARIA EN POLLOS DE ENGORDE, EN UNA EMPRESA DE SANTANDER, COLOMBIA*

AUTOR: ADRIANA ESPERANZA PEÑUELA SÁNCHEZ†

PALABRAS CLAVE: Mortalidad embrionaria, factores asociados, estudios ecológicos.

La incubabilidad está afectada negativamente por la infertilidad y la mortalidad embrionaria (ME). Esta última presenta dos picos, que ocurren en la primera y tercera semana de incubación, los cuales están relacionados con cambios en el metabolismo de los embriones. El propósito de este estudio fue caracterizar la curva de ME y evaluar algunos factores que podrían estar asociados con el promedio de la ME (temprana, intermedia, tardía y total) en huevos de estirpes de pollo de engorde en una empresa de Santander, Colombia. Se realizó un estudio ecológico en el que la unidad de análisis correspondió a un grupo de huevos provenientes de un galpón de reproductoras. Se encontró una mediana de ME total de 9,07% IQR(7,09; 11,97), MET 3,87% IQR(2,7; 5,28), MEI 0,84% IQR(0,23; 1,31), y METa 4,53% IQR(3,36; 6,45). Se analizó la asociación entre cada etapa de mortalidad y algunas variables independientes a través de una regresión binomial negativa multinivel. Se encontró incremento de la frecuencia de todos los tipos de mortalidad en la planta incubadora tradicional comparada con las plantas de ambiente controlado. La edad y el almacenamiento también impactaron la mortalidad; además se encontró una interacción entre estos factores, según la cual almacenar más de 7 días los huevos de gallinas con más de 46 semanas de edad incrementa en 59% la MET comparados con huevos de gallinas jóvenes, almacenados el mismo tiempo. Otros aspectos como el porcentaje de infertilidad, contaminación, malformación, malposición y huevos fisurados también estuvieron relacionados con diferentes etapas de ME. Este tipo de estudios permiten analizar factores de interés poblacional, con el fin de implementar intervenciones para el control de los determinantes de la incidencia de eventos en la población general.

* Tesis de Investigación

† Facultad de salud. Escuela de Medicina, Departamento de salud Pública. Maestría en Epidemiología. Director: Aureliano Hernández; Codirector: Javier Idrovo.

ABSTRACT

TITLE: FACTORS ASSOCIATED WITH EMBRYO MORTALITY IN BROILER, IN AN ENTERPRISE FROM SANTANDER, COLOMBIA*

AUTHOR: ADRIANA ESPERANZA PEÑUELA SÁNCHEZ†

KEY WORDS: Embryonic mortality, factors associated, ecologic studies.

Hatchability is negatively affected by infertility and embryonic mortality (EM). This presents two peaks, which occur in the first and third week of incubation and are related to the changes in the embryo metabolism. The aim of this study was to characterize the EM curve and to evaluate some factors that could be associated with ME (early, intermediate, late and total) in broiler breeder eggs in an enterprise from Santander, Colombia. An ecological study was realized, in which the analysis unit corresponded to a group of eggs from a breeding flock. A median of total EM was 9.07% IQR (7.09; 11.97), EEM 3.87% IQR (2.7; 5.28), IEM 0.84% IQR (0.23; 1.31), and LEM 4.53% IQR (3.36, 6.45). The association between each stage of mortality and some independent variables was analyzed through a multilevel negative binomial regression. We found an increase in the frequency of all types of mortality in the traditional incubator compared to the controlled environment incubator. Age and storage also impacted mortality; in addition, an interaction between these factors was found, according to which storage of eggs of hens over 46 weeks of age increased 59% the EEM compared to eggs of young hens, stored at the same time. Other aspects such as the percentage of infertility, contamination, malformation, malposition and cracked eggs were also related to different EM stages. This type of studies allows analyzing factors of population interest, in order to implement interventions to control determinants of the incidence of events in the general population.

* Research work

† Faculty of Health. School of Medicine, Department of Public Health. Master degree Epidemiology. Director: Aureliano Hernández; Codirector: Javier Idrovo.

INTRODUCCIÓN

A partir de la década de 1970 se planteó la existencia, a nivel internacional, de un cambio estructural en la demanda de carnes, ya que se observó que la carne roja perdió su participación frente a sustitutos como la carne de pollo. Esto se atribuye en parte a la intensificación de la actividad avícola, el aumento de la capacidad de los galpones y la selección genética. Esta última, permite abastecer el mercado de estirpes con mayor capacidad de conversión alimenticia y en consecuencia se disminuye la duración de las etapas de levante y engorde, lo cuál ofrece ventajas frente a productos sujetos a largos ciclos de producción¹. También se ha relacionado este fenómeno, específicamente en Estados Unidos, con cambios en los estilos de vida que buscan conservar un mejor estado de salud², y en otros lugares con la versatilidad, bajo costo respecto a otras carnes y su aceptación en todas las religiones³.

La producción avícola se ha caracterizado por desarrollar un cambio técnico capaz de reducir costos de producción, que le permite competir con los precios de otras fuentes de proteína animal. Además, se observa una integración vertical entre los diferentes eslabones de la cadena de producción (cría, levante, engorde, sacrificio, transformación de la carne y presentación al consumidor) lo cuál permite generar y aprovechar economías de gran escala que favorecen la aceptación del producto en la población.

¹ GALVIS LA. La demanda de carnes en Colombia: un análisis econométrico. Documentos de trabajo sobre economía regional [En línea]. Consultado 2015-08-15. Disponible en: <http://www.banrep.gov.co/sites/default/files/publicaciones/archivos/DTSER13-Carnes.pdf>

² KINNUCAN HW. Effects of health information and generic advertising on U.S. meat demand. *Am j agric econ.* 1997; 79(1):13–23.

³ STENHOUSE S. The poultry industry. En: Pattison M, McMullin P, Bradbury J, Alexander D, editores. *Poultry diseases*. Sexta edición. Elsevier; 2008. pág 2-13

El crecimiento del sector se refleja en cifras oficiales. Hacia 1995, en el mundo se producían alrededor de 55 millones de toneladas de carne. Para 2005 aumentó cerca de 45%, hasta alcanzar una producción de 80 millones y en 2012 se superaron los 90 millones de toneladas. Norte América y Asia contribuyen con cerca del 60% de la producción mundial. Europa muestra estabilidad a lo largo de los años, mientras que Sur América casi dobló su producción entre 1995 y 2005. De esta producción aproximadamente el 86% es carne de pollo, y la restante pertenece a otras especies como patos, pavos, gansos y avestruces⁴.

En Colombia se observa un fenómeno similar. El primer impulso del sector avícola se presentó a partir de la década de 1960 cuando la tasa de crecimiento anual pasó de 1 a 3% y en la década de 1970 se observó un acelerado crecimiento de 15%, para luego mantenerse en 6 y 7,6% en las siguientes dos décadas. A finales de los noventa la producción de pollo ascendió al primer lugar en el abastecimiento de la demanda de proteína animal (incluyendo el consumo de huevo)⁵.

Actualmente, la avicultura colombiana cuenta con 760 millones de aves, alojadas en 7.000 granjas, distribuidas en 360 municipios; con una producción mayor a 8.5 billones de pesos representada por 1.400.000 toneladas de carne y 12.000 millones de huevos al año; y un registro de crecimiento del 5.6% en el 2014, lo que la hace la fuente de cerca de 2 millones de toneladas de proteína económica⁶.

Es evidente el aumento de la producción de carne, y esto se refleja también en el consumo anual per cápita. Hacia la década de 1950 y 1960 el consumo de carne de pollo era de 2.7 Kg por persona al año⁷, en 1998 había alcanzado los 12.5 Kg

⁴ Ibíd.

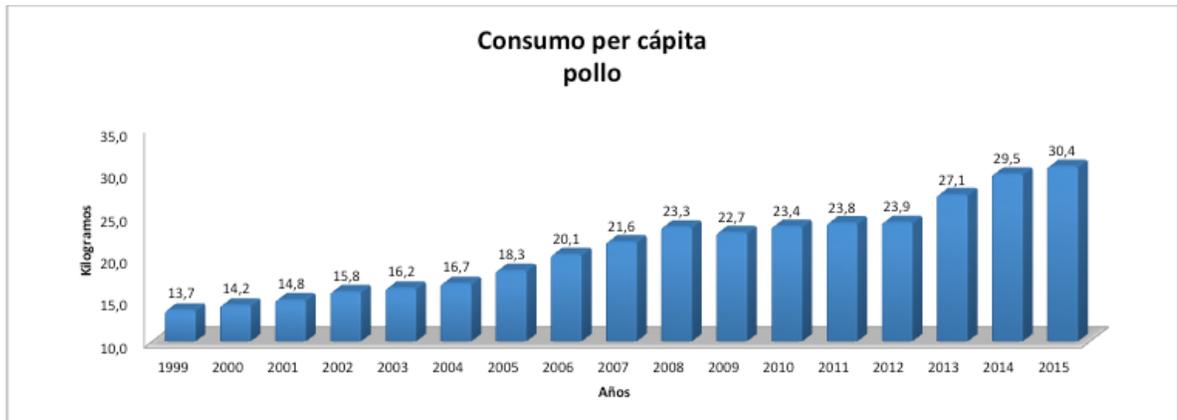
⁵ GALVIS LA, Op. Cit.

⁶ FENAVI. Avicultura: la industria que alimenta a Colombia. Rev avic [En línea]. 2015. Consultado 2015-08-18; 225:42-3. Disponible en: <http://www.fenavi.org/images/stories/revistaavicultores/libros/revista-225>

⁷ GALVIS LA. Op. Cit.

y para 2014 se registró un consumo de 29.3 Kg de carne de pollo por persona al año⁸.

Figura 1: Consumo per cápita de carne de pollo en Colombia



Fuente: FENAVI⁹

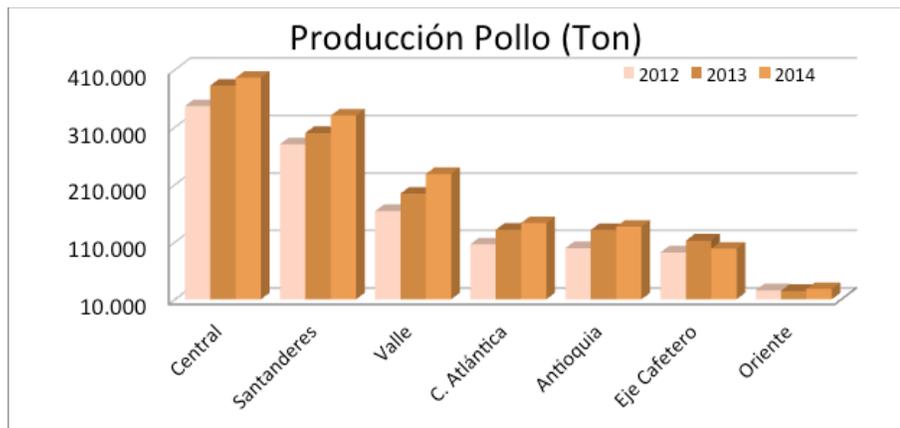
En cuanto a las principales zonas productoras de carne de pollo, en primer lugar se encuentra la zona del centro del país con el 29%, seguida por el departamento de Santander con el 24,3%. Este último, representado por 1.042 granjas registradas, 40 millones de aves alojadas y una producción de 340.000 toneladas de pollo¹⁰.

⁸ FENAVI. Op. Cit.

⁹ FENAVI. Estadísticas Consumo Per Cápita [En línea]. Consultado 2016-02-15. Disponible en: http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2160&Itemid=556

¹⁰ FENAVI. Op. Cit.

Figura 2: Producción de pollo en Colombia



Fuente: FENAVI¹¹ (6)

Este constante crecimiento ha ido de la mano de la genética, que ha mantenido la dinámica de encasamiento gracias al buen número del inventario de abuelas, abuelos y reproductoras; y que ha permitido que el sector de incubación se convierta en un punto estratégico de integración hacia la producción de pollo¹².

El proceso de incubación tiene un impacto importante en la economía de la industria avícola y también un gran interés científico. Por un lado, se desea obtener el mayor porcentaje posible de pollos a partir de los huevos puestos en la incubadora para lograr el mayor costo beneficio, y al mismo tiempo se busca determinar las posibles causas que impiden que se obtenga un pollo viable de un huevo incubado, para modificarlas en pro de mejorar el proceso de incubación artificial para la obtención de la máxima cantidad de pollos de buena calidad, y por consiguiente contribuir a una mayor eficiencia durante la etapa final de producción de carne.

¹¹ FENAVI. Estadísticas Producción público [En línea]. Consultado 2016-02-15. Disponible en: http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2472&Itemid=1330

¹² FENAVI. Avicultura: 2014 con buena calificación. Rev avic [internet]. 2015 [citado 2015 ago 19]; 223:18–37. Disponible en: <http://www.fenavi.org/images/stories/revistaavicultores/pdfs/revista-223.pdf>

Dos aspectos son responsables del resultado en incubación: una correcta cría de los lotes de producción de huevo incubable y un adecuado manejo de las incubadoras. En cada una de estas dos áreas existen diferentes factores que contribuyen a la supervivencia e incubabilidad de los embriones, de los cuales algunos son cruciales mientras que otros tienen un papel menos relevante sobre el resultado final¹³.

Para estudiar los problemas en incubación es necesario entender y separar algunos conceptos que permiten medir el desempeño de los lotes, que tienen diferentes connotaciones y por tanto, diferente manejo al momento de tomar medidas correctivas.

Como primer parámetro se encuentra la incubabilidad, que representa el éxito de la incubación y se mide por el número de pollos de primera calidad producidos, expresado como porcentaje de todos los huevos incubados en la máquina. Una variación de esta medida es la incubabilidad sobre fértiles, que permite medir la eficiencia de la máquina incubadora, y toma como medida el porcentaje de pollos nacidos dividido el porcentaje de huevos fértiles que ingresaron a la incubadora¹⁴.

Se estableció que cerca del 83% de los huevos producen un pollo de primera calidad. La incubabilidad varía durante la vida del lote, inicialmente es baja pero rápidamente alcanza un pico máximo y luego comienza a disminuir gradualmente a medida que las gallinas envejecen. Del 17% que no eclosionan, el 7% corresponde a huevos infértiles y con muerte embrionaria temprana, el 9% mueren

¹³ LANDAUER W. Hatchability of chicken eggs as influenced by environment and heredity. [En línea]. Monografía. Storrs agricultural experiment station: Exp Stn Univ Conn. 1967. Consultado 2015-02-10. Disponible en: <http://digitalcommons.uconn.edu/saes/1>

¹⁴ COBB VANTRESS. Guía de manejo de la incubadora [En línea]. 2013. Citado 2015-04-6. Disponible en: <http://www.cobb-vantress.com/docs/default-source/guides/cobb-hatchery-management-guide---spanish.pdf?sfvrsn=2>

en la cáscara y el 1% se deshecha¹⁵. Las causas a las cuales se atribuye estas pérdidas se listan a continuación.

Tabla 1: Causas de fallas en la eclosión

Causa	Porcentaje
Infertilidad	20
Almacenamiento del huevo	25
Contaminación por bacterias u hongos	12
Defecto del huevo o daño de la cáscara	10
Falla en incubación	5
Nutrición	10
Enfermedades	10
Genética	8

Modificado de: Alcorn MJ. How to carry out a field investigation. Poultry Diseases. Elsevier; 2008

La incubabilidad esta afectada por dos importantes aspectos: la fertilidad y la mortalidad embrionaria. La primera hace referencia a la capacidad del espermatozoide y el óvulo para dar lugar a un huevo embrionado. La fertilidad se puede determinar durante la incubación, después de iniciado el desarrollo embrionario y se calcula a partir del porcentaje de huevos fértiles sobre el total de huevos incubados. Por otro lado, la mortalidad embrionaria determina cuantos embriones detuvieron su desarrollo durante cualquier momento en los 21 días de incubación y esta dada por el porcentaje de los embriones muertos sobre el total de huevos fértiles.

¹⁵ ALCORN MJ. How to carry out a field investigation. En: Pattison M, McMullin P, Bradbury J, Alexander D., editores. Poultry diseases. Sexta edición. Elsevier; 2008. pág 14-38

Tener clara la contribución de la fertilidad y la mortalidad en el resultado de la incubabilidad, facilita detectar las fallas tanto en granja como en incubación, que contribuyen a alterar los parámetros estándar establecidos para cada línea de pollo de engorde, y permite enfocar las soluciones hacia puntos críticos y obtener al final la mayor cantidad de pollos de alta calidad de la totalidad de los huevos que se ingresaron a la incubadora.

La mortalidad embrionaria es un problema de gran importancia económica en la industria avícola. A principios del siglo XX, cuando los lotes eran pequeños, la muerte embrionaria no superaba el 10%, sin embargo, hacia 1950 cuando los métodos primitivos de manejo de las aves fueron sustituidos por modernas prácticas de producción intensiva, reproducción en confinamiento e incubación artificial a gran escala, la mortalidad embrionaria frecuentemente alcanzaba el 25% o más¹⁶. Actualmente, el desarrollo de líneas especializadas, su selección hacia parámetros ideales y el desarrollo tecnológico de las incubadoras ha permitido establecer límites para cada estirpe, bajo los cuales se ha comprobado la capacidad de eclosión en condiciones ideales de incubación.

Las líneas genéticas utilizadas en la industria avícola colombiana provienen de empresas extranjeras y los parámetros productivos han sido obtenidos en condiciones experimentales en sus países de origen. Esto ha permitido establecer manuales de manejo de las reproductoras y de los huevos durante la incubación, los cuales se implementan lo más fielmente posible para alcanzar estas metas. En el país no existen datos consolidados de mortalidad embrionaria, sin embargo cada empresa lleva controles internos para detectar puntos críticos e implementar cambios, de acuerdo a las condiciones locales, que impacten en el mejoramiento

¹⁶ ROMANOFF AL. Critical periods and causes of death in avian embryonic development. The auk. 1949; vol. 66 (3): 264–70.

de la incubabilidad, basados en los parámetros internacionales establecidos para cada estirpe que se maneja en las granjas.

Tabla 2: Parámetros (%) esperados para la estirpe Ross 308

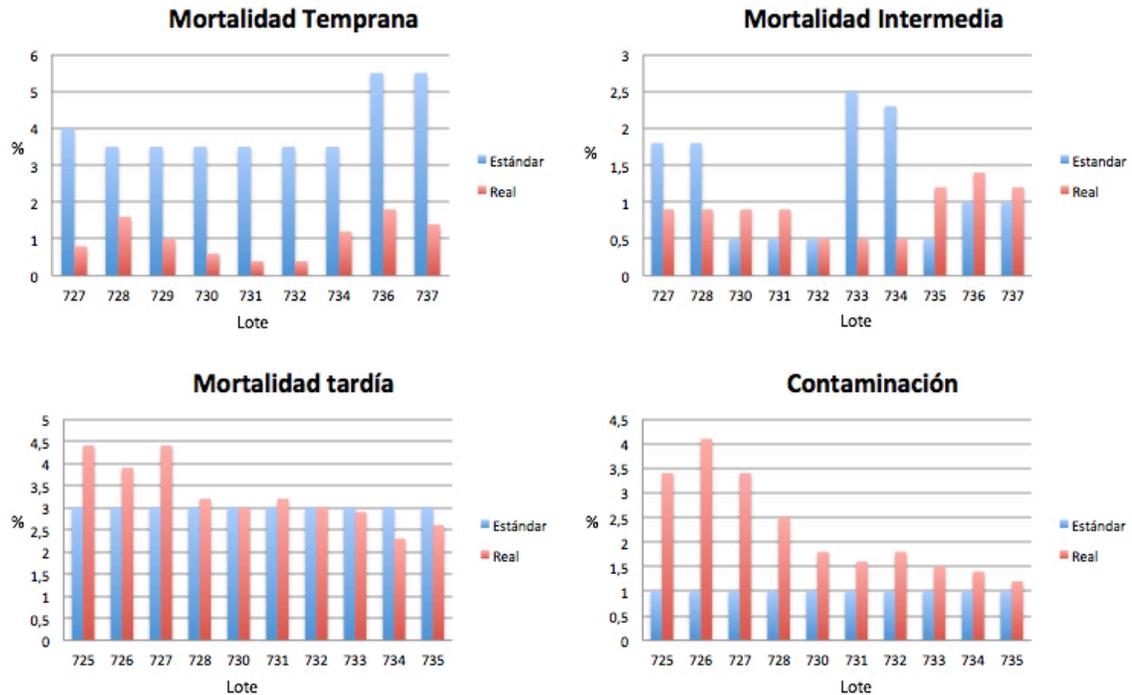
Edad del lote	Estado del desarrollo embrionario						
	Infértiles	Mortalidad temprana	Mortalidad intermedia	Mortalidad tardía	Picoteo externo	Quebrados	Contaminados
25-30 semanas	6	5,5	1	3,5	1	0,5	0,5
31-45 semanas	2,5	3,5	0,5	2,5	0,5	0,5	0,5
46-50 semanas	5	4	1	2,5	0,5	0,5	0,5
51-60 Semanas	8	4,5	1	3	0,5	1	1

Fuente: AVIAGEN. Investigación de las prácticas de incubación 2009¹⁷ (12).

Teniendo en cuenta estas tablas y las experiencias de campo, se puede observar un ejemplo del comportamiento de algunos lotes de una empresa de pollo de engorde de Santander, en los cuales algunos objetivos se cumplen y otros no. En este caso es evidente que la mortalidad temprana se encuentra en niveles adecuados; sin embargo, la mortalidad intermedia, tardía y la contaminación de los huevos durante el proceso están fuera de los rangos permitidos, lo que implica pérdidas en nacimiento y por tanto, menor eficiencia del proceso de producción.

¹⁷ TULLETT S. Como investigar las prácticas de incubación [En línea]. Ross Tech. 2009. Citado 2015-08-3. Disponible en: <http://www.avicol.co/descargas2/RossTechInvpracticass.pdf>

Figura 3: Mortalidad embrionaria en algunos lotes durante julio y agosto de 2015



Fuente: Empresa avícola de Santander

Numerosos estudios han intentado determinar las causas de muerte durante el periodo de incubación, no solo en pollos sino también en aves silvestres y otras especies menos comunes destinadas a consumo humano como patos, pavos o codornices. Hutt y Pilkey en 1930 y Nicolaidis en 1933 evaluaron la mortalidad asociada al horario de puesta de los huevos^{18,19}. Otros estudios se han enfocado en condiciones del nido y el ambiente de cría de las reproductoras^{20,21,22}, la

¹⁸ HUTT FB, PILKEY AM. Studies in Embryonic Mortality in the Fowl: IV: Comparative Mortality Rates in Eggs Laid at Different Periods of the Day and their Bearing on Theories of the Origin of Monsters. *Poult Sci.* 1930;9(3):194–203.

¹⁹ NICOLAIDES C. Relation of time of laying and embryonic mortality. *Poult sci.* 1933; 12(4):274–6.

²⁰ FASENKO GM, WILSON JL, ROBINSON FE, HARDIN RT. Effects of length of egg nest holding time and high environmental temperatures on prestorage embryonic development, survival, and hatchability of broiler breeders. *J appl poult res.* 1999;8(4):488–92.

temperatura y humedad relativa durante la incubación^{23,24,25,26}, las condiciones de almacenamiento preincubación^{27,28,29}, factores genéticos^{30,31}, contaminación^{32,33,34}, entre otros aspectos que impactan la mortalidad embrionaria, y por tanto el resultado final de incubabilidad y que serán revisados detalladamente en los próximos capítulos.

²¹ COOK MI, BEISSINGER SR, TORANZOS G, ARENDT WJ. Effects of incubation on avian eggshell microbial processes: implications for maintaining egg viability prior to clutch completion. *Ecol Lett.* 2005;8:532–7.

²² DE REU K, GRIJSPEERDT K, HEYNDRIKX M, ZOONS J, DE BAERE K, UYTENDAELE M, et al. Bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and aviary housing systems for laying hens. *Br poult sci.* 2005;46(2):149–55.

²³ NOIVA RM, MENEZES AC, PELETEIRO MC. Influence of temperature and humidity manipulation on chicken embryonic development. *Bmc vet res.* 2014;10(1):1–21.

²⁴ VAN DER POL CW, VAN ROOVERT-REIJRINK IA, MAATJENS CM, VAN DEN BRAND H, MOLENAAR R. Effect of relative humidity during incubation at a set eggshell temperature and brooding temperature posthatch on embryonic mortality and chick quality. *Poult sci.* 2013;92(8):2145–55.

²⁵ SWANN GS, BRAKE J. Effect of dry-bulb temperature, relative humidity, and eggshell conductance during the first three days of incubation on egg weight loss and chick weight. *Poult sci.* 1990;69(4):535–44.

²⁶ YILDIRIM I, YETISIR R. Effects of different hatcher temperatures on hatching traits of broiler embryos during the last five days of incubation. *S afr j anim sci.* 2004; 34(4):211–6.

²⁷ FASENKO GM. Egg storage and the embryo. *Poult Sci.* 2007;86(5):1020–4.

²⁸ KHAN MJA, KHAN SH, BUKHSH A, ABBASS MI, JAVED M. Effect of different storage period on egg weight, internal egg quality and hatchability characteristics of Fayumi eggs. *Ital J Anim Sci.* 2013;12(2):51.

²⁹ REIJRINK IA, MEIJERHOF R, KEMP B, VAN DEN BRAND H. The chicken embryo and its micro environment during egg storage and early incubation. *Worlds Poult Sci J.* 2008; 64(4):581–98.

³⁰ SEWALEM A, WILHELMSON M. Genetic study of embryonic mortality in White Leghorn lines selected for egg production traits. *Br Poult Sci.* 1999;40(4):467–71.

³¹ LIPTÓI K, HIDAS A. Investigation of possible genetic background of early embryonic mortality in poultry. *Worlds Poult Sci J.* 2006;62(2):326–37.

³² DE REU K, GRIJSPEERDT K, HEYNDRIKX M, ZOONS J, DE BAERE K, UYTENDAELE M, et al. *Op. Cit.*

³³ DE REU K, GRIJSPEERDT K, MESSENS W, HEYNDRIKX M, UYTENDAELE M, DEBEVERE J, et al. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. *Int J Food Microbiol.* 2006; 112(3):253–60.

³⁴ FURUTA K, MARUYAMA S. Bacterial contamination on eggs during incubation and hatching, and of fluffs of newly-hatched chicks. *Br Poult Sci.* 2008;22(3):247–54.

1. JUSTIFICACIÓN

La realización de este proyecto proporciona información relevante en cuanto a la caracterización de la mortalidad embrionaria, en aves comerciales, que podría dar indicios del comportamiento real en el país de estirpes que hasta el momento solo han sido evaluadas en otros lugares del mundo.

Es un ejercicio académico que aporta al conocimiento de las condiciones de incubación en Colombia. Además, la literatura que se encuentra a nivel nacional es limitada, la mayoría de estudios son extranjeros y hacen énfasis principalmente en el resultado final de incubabilidad más que en detallar el tema de mortalidad embrionaria.

El principal diseño usado en estos trabajos de investigación es experimental, por lo cual se excluyen condiciones reales de la industria de reproductoras e incubación, y hace interesante realizar un diseño observacional, en el cual se pueda determinar como influyen los múltiples factores sobre el parámetro de mortalidad embrionaria, en situaciones prácticas.

Adicionalmente, la forma de manejo de las reproductoras admite aplicar un diseño ecológico al presente estudio en el cual las unidades de análisis sean los diferentes grupos de huevos, lo que permitirá evaluar los efectos de diferentes variables ecológicas sobre la incidencia de mortalidad embrionaria y a partir de los resultados, tomar decisiones que impacten positivamente este problema en un contexto productivo. Además, hay que tener en cuenta que por la naturaleza de la población (las reproductoras tienen una vida máxima de 64 semanas de edad y el periodo de incubación es de 21 días) y de su manejo en campo, el efecto de las medidas implementadas se puede observar rápidamente, por lo cual adoptar medidas de control poblacionales puede resultar más beneficioso que buscar un

enfoque individual del cual pueden obtenerse resultados que en la práctica no representen alguna utilidad. Por otro lado, el diseño ofrece facilidades para obtener datos de posibles factores relacionados con la mortalidad a partir de fuentes secundarias, lo que implica menores costos para su realización.

También, es necesario tener en cuenta que la avicultura ocupa un lugar importante en la economía colombiana, y especialmente en el departamento de Santander, por lo cual adoptar medidas que disminuyan el impacto de un problema grave como lo es la mortalidad embrionaria en las plantas de incubación, contribuye a disminuir los costos de producción y a hacer el proceso más eficiente al maximizar las probabilidades de obtener mayor número de pollos de excelente calidad.

2. HIPÓTESIS

Existen factores relacionados con eventos en granja, transporte e incubación de los huevos, que afectan el promedio de incidencia de mortalidad embrionaria, durante el proceso de incubación de pollo de engorde, en una empresa avícola en el departamento de Santander, Colombia.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Identificar los factores asociados al comportamiento del promedio de la incidencia de muerte embrionaria en incubación y su impacto en la reducción del nacimiento de pollos de alta calidad en una empresa avícola de Santander.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Determinar el promedio de incidencia de mortalidad embrionaria temprana y describir su comportamiento durante los primeros 7 días de la incubación.
2. Determinar el promedio de incidencia de mortalidad embrionaria intermedia y describir su comportamiento durante los días 8 a 14 de la incubación.
3. Determinar el promedio de incidencia de mortalidad embrionaria tardía, huevos picados no nacidos y malposiciones y describir su comportamiento durante los últimos 7 días de la incubación.
4. Caracterizar la curva de mortalidad embrionaria durante el periodo de incubación de huevos.
5. Identificar los factores asociados al promedio de la incidencia de la mortalidad embrionaria durante la incubación de huevos.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 INCUBACIÓN

El huevo recién puesto contiene la mayoría de los materiales necesarios para el desarrollo y crecimiento del embrión, excepto el oxígeno (O₂) y el calor necesarios para el proceso. Los poros microscópicos en la cáscara permiten que el O₂ se difunda del ambiente al embrión, y el vapor de agua y el dióxido de carbono (CO₂) sean eliminados. El calor es proporcionado por el ave adulta, que además controla el microclima del huevo en condiciones naturales; o por la máquina incubadora, que en la industria avícola actual sustituye el papel de la madre³⁵.

La incubación abarca el periodo prenatal, previo al picoteo interno, en el cual el pico atraviesa la membrana corioalantoidea y las membranas de la cáscara en la cámara de aire; y el periodo perinatal, cuando el embrión fractura la cáscara (picoteo externo) y eclosiona³⁶. Estas dos etapas se desarrollan en dos tipos de máquina: el periodo inicial, aproximadamente los primeros 18 días, se lleva a cabo en la incubadora, y los últimos 3 o 4 días, los embriones se trasladan a la bandeja de nacimientos³⁷ en la cual se produce la eclosión.

La industria avícola usa múltiples parámetros para evaluar los resultados de los procesos relacionados con la producción de pollo de engorde para optimizar los costos de producción y obtener la mayor eficiencia. El principal parámetro usado en incubación es la incubabilidad, que mide la cantidad de pollos de primera

³⁵ MUELLER CA, BURGGREN WW, TAZAWA H. The physiology of the avian embryo. *Sturkie's Avian Physiology* [Internet]. Sexta edición. Elsevier; 2015 [citado 2015 Apr 3]. pág 739-766. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124071605000324>

³⁶ *Ibíd.*

³⁷ VAN DE VEN LJF, BALLER L, VAN WAGENBERG A V, KEMP B, VAN DEN BRAND H. Effects of egg position during late incubation on hatching parameters and chick quality. *Poult Sci.* 2011;90(10):2342-7.

calidad producidos expresado como un porcentaje de todos los huevos incubados³⁸.

La incubabilidad está inversamente afectada por otros dos parámetros importantes: la infertilidad y la mortalidad, que tienen un impacto económico importante en la industria. Este segundo parámetro, la mortalidad embrionaria, será el tema de interés de los siguientes contenidos.

4.2 MORTALIDAD EMBRIONARIA

Los análisis de la mortalidad embrionaria en pollos demuestran que esta no se encuentra uniformemente distribuida a lo largo del periodo de incubación y se ha podido establecer, por medio de modelos matemáticos, que la curva de mortalidad presenta dos picos característicos durante las diferentes fases del desarrollo del pollo; estos ocurren en la primera y tercera semana y están relacionado con los cambios en el metabolismo de los embriones³⁹.

4.2.1 Etapas de la mortalidad embrionaria. De acuerdo con la semana en que muere el embrión, la clasificación es la siguiente:

4.2.1.1 Mortalidad embrionaria temprana (MET). Sucede en la primera semana de incubación⁴⁰. Se observa que es especialmente alta entre el día 3 y 5 y coincide con el pico de producción de ácido láctico; ocurre durante el cambio en la eliminación del CO₂, o también por hidronefrosis⁴¹ que resulta de una obstrucción

³⁸ COBB VANTRESS. Op. Cit.

³⁹ JASSIM EW, GROSSMAN M, KOOPS WJ, LUYKX RAJ. Multiphasic analysis of embryonic mortality in chickens. *Poult Sci.* 1996;75(4):464–71.

⁴⁰ LIPTÓI K, HIDAS A. Op. Cit.

⁴¹ ROMANOFF AL. Op. Cit.

mecánica del mesonefros cuando este órgano comienza a funcionar⁴². Romanoff en 1949, a partir de diferentes estudios, mencionó otras posibles causas de MET dentro de las que se incluye un desajuste respiratorio antes del establecimiento de la superficie respiratoria (área vascular y corioalantoides) que aparece los primeros 3 o 4 días. Por otro lado, los carbohidratos son la fuente principal de energía del embrión en este momento y probablemente el CO₂ se acumula en suficiente cantidad para resultar fatal. Incluso, un estudio reportó que hay una concentración máxima de ácido láctico al tiempo que la enzima que lo descompone esta presente en pequeñas cantidades. Adicionalmente se reportó que el nitrógeno en el periodo de desarrollo temprano es excretado en forma de amonio, el cuál es muy tóxico para el embrión⁴³.

En las incubadoras es común descartar los huevos que con el ovoscopio se observan claros; y aunque puede asumirse que la mayoría son huevos infértiles, al realizar el diagnóstico individual de mortalidad, se ha comprobado que estos huevos contienen embriones que detuvieron su desarrollo y contribuyen en mayor proporción a la disminución de la incubabilidad que los huevos infértiles⁴⁴. Por este motivo es importante establecer la diferencia clara entre infertilidad y mortalidad temprana, ya que las causas que generan el problema son diferentes y por tanto requieren intervenciones específicas.

4.2.1.2 Mortalidad embrionaria intermedia (MEI). En este periodo la mortalidad generalmente es baja. En codornices criadas en cautiverio se ha relacionado con una dieta deficiente en proteína animal, minerales (especialmente calcio) o vitaminas. En un estudio se observó que aumentaba en animales con dieta de origen exclusivamente vegetal, o en invierno cuando las aves recibían cantidades insuficientes de sol o de vitamina D. También deficiencias de vitamina E y

⁴² LIPTÓI K, HIDAS A. Op. Cit.

⁴³ ROMANOFF AL. Op. Cit.

⁴⁴ DEEMING DC, VAN MIDDELKOOP JH. Effect of strain and flock age on fertility and early embryonic mortality of broiler breeder eggs. Br Poult Sci. 1999;40 Suppl:S22-3.

riboflavina, pueden aumentar la mortalidad en este periodo. En un estudio se reportaron anomalías de crecimiento en los embriones con deficiencia de riboflavina, en los cuales el peso es consistentemente menor que el normal (entre 20 y 90%)⁴⁵.

4.2.1.3 Mortalidad embrionaria tardía (METa). Ocurre durante la tercera semana de incubación y tiende a aumentar hacia el día 19⁴⁶, cuando la demanda de oxígeno por parte del embrión incrementa significativamente⁴⁷. Puede ser causada por una falla de la transición de la respiración alantoidea a la pulmonar. Al final del periodo de desarrollo, los efectos acumulativos de condiciones de incubación desfavorables pueden resultar en la pobre viabilidad del embrión y los cambios anormales en el estado fisicoquímico de los fluidos del embrión son especialmente importantes⁴⁸.

4.2.2 Factores que afectan la mortalidad embrionaria. En la industria avícola lo ideal es que todo huevo fértil tenga la capacidad de producir un pollo sano, sin embargo, esto no es posible debido a numerosos factores que afectan al embrión durante el proceso de incubación. Desde anomalías cromosómicas letales, edad, nutrición y salud del lote de reproductoras, características físicas del huevo, factores ambientales y de manejo del huevo durante el almacenamiento, hasta problemas en la incubadora afectan al embrión en cualquier día del desarrollo y alteran los parámetros de incubabilidad esperados para cada lote.

4.2.2.1 Calidad del semen. Inmediatamente ocurre la ovulación, el óvulo es atrapado por el infundíbulo donde ocurre la fertilización antes que se agregue la capa perivitelina externa. Para lograr la fertilización el espermatozoide debe

⁴⁵ ROMANOFF AL. Op. Cit.

⁴⁶ ROMANOFF AL. Op. Cit.

⁴⁷ LIPTÓI K, HIDAS A. Op. Cit.

⁴⁸ ROMANOFF AL. Op. Cit.

atravesar la membrana perivitelina interna, por medio de la digestión de la membrana por las enzimas acrosomales y posterior penetración del espermatozoide para alcanzar el pronúcleo femenino⁴⁹, lo que deja como rastro un agujero en la membrana perivitelina. Estos agujeros son usados para calcular la penetración espermática, que depende de la cantidad de esperma transportado y liberado en la región del infundíbulo, la dosis seminal almacenada en el oviducto⁵⁰, la duración del almacenamiento del semen en el oviducto y la edad de la gallina⁵¹. Esta penetración se ha relacionado con el éxito de la fecundación y la ocurrencia de MET.

4.2.2.2 Genética. Las anomalías genéticas contribuyen especialmente a la MET. El cariotipo del pollo tiene un número diploide (2n) de 78 cromosomas, siendo el macho homogamético ZZ y la hembra heterogamética ZW. Por medio de marcadores cromosómicos se han podido detectar diferentes alteraciones en el número de cromosomas, que resultan en haploidía (1n), poliploidía (3,4,6n) y aneuploidía, donde hay alteraciones numéricas en diferentes pares de cromosomas (trisomía 2n+1, monosomía 2n-1, entre otros); y también alteraciones en la estructura de los cromosomas que se presentan con menos frecuencia. En un estudio, se evaluaron 4.182 embriones de diferentes razas y se encontró alteración del número de cromosomas en el 2,5%, variando de 0,4% a 8,9% según la raza. Un promedio de 10.8% de los embriones que sufrieron MET, presentaron euploidia (excepto diploidía) o aneuploidía, variando de 2.3 a 23.7% según la raza. Los embriones haploides se observaron subdesarrollados al cuarto día y murieron entre el quinto y séptimo día. El 90% de los embriones triploides murieron el día 4

⁴⁹ ROMANOFF AL. The avian embryo. Structural and functional development. New York and London: The Macmillan Co., New York; 1960.

⁵⁰ BRAMWELL RK, MARKS HL, HOWARTH B. Quantitative Determination of Spermatozoa Penetration of the Perivitelline Layer of the Hen's Ovum as Assessed on Oviposited Eggs. *Poult Sci.*1995;74(11):1875–83.

⁵¹ BRILLARD JP, MCDANIEL GR. Influence of Spermatozoa Numbers and Insemination Frequency on Fertility in Dwarf Broiler Breeder Hens. *Poult Sci.*1986;65(12):2330–4.

y los restantes antes de la eclosión. Los embriones con trisomía estaban subdesarrollados o muertos al cuarto día y la tetraploidia fue letal en estados muy tempranos⁵².

Otro ejemplo de defecto genético letal es el anillo de sangre (trastorno heredado como un rasgo autosómico recesivo) que describe una condición que se expresa entre 48 y 66 h de incubación y se caracteriza por la presencia de islas de sangre no fusionadas, la ausencia de arterias vitelinas y un seno terminal congestionado con eritrocitos. El mecanismo de expresión de este gen aun no se conoce⁵³. De forma similar, se ha descrito la degeneración del blastodermo como una condición letal que puede reducir en un 25% la eclosión de embriones de raza Leghorn. Se evidencia a las 32 horas de incubación y a las 120 horas, el blastodermo presenta fragmentos dispersos en la superficie de la yema. También es la expresión de un gen autosómico recesivo y tampoco se conoce el mecanismo de expresión⁵⁴.

4.2.2.3 Teratogénesis. Se atribuye un pequeño porcentaje de muertes embrionarias a anomalías estructurales, dentro de las cuales las más frecuentes son hipercefalia, microftalmia y exencefalia⁵⁵. En un experimento en huevos Leghorn, se observó aumento de la incidencia de malformaciones en embriones sometidos a altas temperaturas, relacionadas especialmente con la pared abdominal, cabeza, cráneo y piernas. Se encontraron varias formas en un mismo embrión, lo que podría sugerir que hay un daño en las células madre

⁵² BLOOM SE. Chromosome abnormalities in chicken (*Gallus domesticus*) embryos: Types, frequencies and phenotypic effects. *Chromosoma*. 1972;37(3):309–26.

⁵³ SAVAGE TF, DEFRANK MP, BREAN SE. Blood ring: an early embryonic lethal condition in chickens. *J Hered*. 1988;79(2):124–8.

⁵⁴ SAVAGE TF, MIROSH LW, JONES JL, SCHNEIDERMAN ET. Blastoderm Degeneration, an Early Embryonic Failure in Dwarf Single Comb White Leghorn Chickens. *J Hered*. 1992;83(4):249–54.

⁵⁵ ROMANOFF AL. Op. Cit.

causado por el estrés térmico y que deja secuelas en varios órganos o afecta el crecimiento de estructuras de soporte claves⁵⁶.

4.2.2.4 Desarrollo del embrión en el momento de la ovoposición. Desde la fertilización hasta que el huevo está listo para la puesta, transcurren cerca de 25 a 26 horas⁵⁷. Si el huevo completamente formado llega al final de la cloaca durante el día, es puesto; de lo contrario es probable que se conserve hasta el día siguiente. Esta retención durante la noche es uno de los factores que explica la variabilidad en la etapa de desarrollo alcanzado en el momento de la puesta⁵⁸. Otros factores relacionados son el tipo de nido, la frecuencia de recolección y las condiciones ambientales de la granja, que pueden influir sobre la tasa de enfriamiento del huevo y generar diferencias en el desarrollo de los embriones⁵⁹. Teniendo en cuenta esto, se ha reportado que la pre-gástrula y la gástrula temprana, son más comunes en huevos con pobres resultados de incubabilidad, mientras que los huevos con buenos resultados contienen embriones puestos en estado de gástrula avanzada o estadio EGKX^{60,61}.

En diferentes estudios se ha asociado la incubabilidad y el horario de puesta del huevo, pero con resultados contradictorios. Según Bernier et al., los huevos puestos antes de las 8 de la mañana y después de las 2 de la tarde tuvieron menor incubabilidad respecto a los huevos puestos durante el resto del día⁶². Hutt

⁵⁶ NOIVA RM, MENEZES AC, PELETEIRO MC. Op. Cit.

⁵⁷ REIJRINK IA, MEIJERHOF R, KEMP B, VAN DEN BRAND H. Op.Cit.

⁵⁸ PATTEN BM. The Early Embryology of the Chick. Philadelphia: Hijo de P. Blakiston y Co. 1920.

⁵⁹ CHRISTENSEN V. Factors associated with early embryonic mortality. Worlds Poult Sci J. 2001;57(04):359-372.

⁶⁰ REIJRINK IA, MEIJERHOF R, KEMP B, VAN DEN BRAND H. Op. Cit.

⁶¹ HAYS FA, NICOLAIDES C. Variability in Development of Fresh-Laid Hen Eggs. Poult Sci. 1934;13(2):74–80.

⁶² BERNIER PE, TAYLOR LW, GUNNS CA. The relative effects of inbreeding and outbreeding on reproduction in the domestic fowl. Tesis doctoral [En línea]. Hilgardia 20(21). 1951. Citado 2015-04-05. p. 529–628. Disponible en: <http://hilgardia.ucanr.edu/Abstract/?a=hilg.v20n21p529>

y Pilkey en 1930⁶³ y McNally y Byerly en 1936 informaron que los huevos puestos en la mañana eclosionan mejor que los huevos puestos por la tarde⁶⁴, mientras Funk en 1934 concluyó lo contrario, que los huevos de la tarde eclosionan un poco mejor que los huevos de la mañana⁶⁵. También, los huevos que requieren menos de 23 horas, o más de 27 horas para su formación, no eclosionan tan bien como aquellos que requieren entre 23 y 27 horas. La ovoposición prematura y retrasada aparentemente resulta en la disminución de los nacimientos⁶⁶.

Otra característica que se considera que puede alterar el estadio de desarrollo del embrión al momento de la puesta es el tiempo que transcurre mientras el huevo pasa a través del oviducto. Warren y Scott en 1935 midieron el oviducto de 19 gallinas y encontraron que su longitud estaba entre 555 y 730 mm⁶⁷; posteriormente en otro estudio calcularon los tiempos que gasta el huevo en pasar cada una de las regiones del oviducto, y encontraron que las diferencias en la longitud del intervalo entre la ovulación y la ovoposición, son causadas por el tiempo que el huevo tarda en la glándula de la cáscara⁶⁸, lo que a su vez influye en las diferencias encontradas en el estadio de desarrollo de los huevos al momento de la puesta. Algunos estudios asociaron la diferencia de tiempo al paso por esta región y además, a la posición del huevo en la secuencia, y encontraron que los huevos que terminaron la secuencia se demoraron 2 horas más en ser puestos, lo que incrementó el desarrollo del embrión a la puesta⁶⁹.

⁶³ NICOLAIDES C. Op. Cit.

⁶⁴ MCNALLY EH, BYERLY TC. Variation in the Development of Embryos of Hens' Eggs. *Poult Sci.* 1936;15(4):280-3.

⁶⁵ FUNK EM. Relation of Time of Laying to Hatchability. *Poult Sci.* 1934;13(3):184-7.

⁶⁶ MCNALLY EH, BYERLY TC. Op. Cit.

⁶⁷ WARREN DC, SCOTT HM. The Time Factor in Egg Formation. *Poult Sci.* 1935;14(4):195-207.

⁶⁸ WARREN DC, SCOTT HM. Physiological factors influencing the rate of egg formation in the domestic hen. *Journal of Agricultural Research.* 1935;51: 565-72.

⁶⁹ ROBINSON FE, HARDIN RT, ROBINSON NA, WILLIAMS BJ. The Influence of Egg Sequence Position on Fertility, Embryo Viability, and Embryo Weight in Broiler Breeders. *Poult Sci.* 1991;70(4):760-5.

En conclusión, el estadio de desarrollo del embrión está relacionado positivamente con la incubabilidad, pero así mismo, esta relación se puede ver afectada por factores genéticos y por diferencias en las condiciones óptimas de incubación⁷⁰.

4.2.2.5 Almacenamiento de huevos. En la industria avícola, los huevos se almacenan a bajas temperaturas hasta que son llevados a la incubadora y programados según la demanda y la coordinación de las actividades de la incubadora. Esto le permite al embrión sobrevivir hasta que las condiciones de incubación sean adecuadas para reiniciar el desarrollo, ya que al disminuir la temperatura, el embrión alcanza el cero fisiológico, entre 20 y 21°C⁷¹, en el cual las células blastodérmicas son capaces de mantener la actividad mitótica, pero el desarrollo embrionario se detiene⁷². Es posible que esta hiperplasia permita al embrión tener una reserva de células al momento de reactivar la incubación, para compensar la muerte celular inducida por el almacenamiento⁷³. Existe discrepancia entre algunos autores que sitúan el cero fisiológico alrededor de 28°C⁷⁴ y otros entre 25 y 27°C. Es probable que esto se deba a que existen diferencias en el desarrollo de los tejidos de los embriones, que pueden hacer que estos tengan diferentes requerimientos de temperatura mínima para sobrevivir⁷⁵.

Basados en las diferencias en el desarrollo del embrión a la ovoposición y su efecto sobre el almacenamiento del huevo, se han desarrollado métodos de incubación previos al almacenamiento, que permiten obtener embriones más

⁷⁰ REIJRINK IA, MEIJERHOF R, KEMP B, VAN DEN BRAND H. Op. Cit.

⁷¹ CHARLES LINCOLN E. The Physiological Zero and the Index of Development for the Egg of the Domestic Fowl, *Gallus domesticus*. Science New Series. 1902; 15(379):521–2.

⁷² DYMOND J, VINYARD B, NICHOLSON AD, FRENCH NA, BAKST MR. Short periods of incubation during egg storage increase hatchability and chick quality in long-stored broiler eggs. *Poult Sci*. 2013;92(11):2977–87.

⁷³ *Ibíd.*

⁷⁴ FUNK EM, BIELLIER H V. The Minimum Temperature for Embryonic Development in the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *Poult Sci*. 1944 3(6):538–40.

⁷⁵ FASENKO GM. Op. Cit.

desarrollados que pueden sobrevivir durante este periodo y activar adecuadamente su crecimiento cuando inicia la incubación⁷⁶. Con esto, se espera que el embrión haya alcanzado el estado EGKXII o EGKXIII, en los que el embrión ha completado la formación del hipoblasto y la migración y diferenciación celular son mínimas, lo que permite una mayor sobrevivencia a periodos largos de incubación que los embriones que están en estados menores o más avanzados^{77,78}.

En un estudio, Fasenکو encontró que la incubabilidad de huevos almacenados durante 4 días no fue influenciada por el precalentamiento, mientras que los que fueron almacenados durante 14 días, sí mejoraron su incubabilidad después de 6 horas de ser precalentados a 37.5°C⁷⁹; algo similar encontró Lourens en 2006⁸⁰.

En otros experimentos se encontró que la incubación prealmacenamiento ofrece la posibilidad de mejorar la capacidad de eclosión en lotes con tiempos cortos de almacenamiento, pero no es capaz de compensar el efecto negativo de almacenamientos prolongados. Reijrink et al. en 1976, observaron que la incubación prealmacenamiento permitió que los embriones pasaran de la etapa EGKIX (al momento de la recolección) a la EGKXII (al almacenamiento), y tuvo un efecto importante sobre la viabilidad en la incubación temprana ya que la mortalidad a los dos primeros días de incubación fue 3.1% mayor en los embriones no preincubados cuando se almacenaron durante 11 días. Sin embargo, se observó el efecto contrario cuando se preincubaron embriones que al momento de la recolección estaban en etapas EGK>XII y que se almacenaron

⁷⁶ *Ibíd.*

⁷⁷ REIJRINK IAM, MEIJERHOF R, KEMP B, GRAAT EAM, VAN DEN BRAND H. Influence of prestorage incubation on embryonic development, hatchability, and chick quality. *Poult Sci.* 2009;88(12):2649–60.

⁷⁸ FASENKO GM, ROBINSON FE, WHELAN AI, KREMENIUK KM, WALKER JA. Prestorage Incubation of Long-Term Stored Broiler Breeder Eggs: 1. Effects on Hatchability. *Poult Sci.* 2001;80(10):1406–11.

⁷⁹ *Ibíd.*

⁸⁰ LOURENS A. Heating eggs before storage. *World Poult.* 2006;22:22–3.

por 12 días, lo que concuerda con otros estudios y hace posible establecer la hipótesis de que la incubación prealmacenamiento es más beneficiosa para embriones que se encuentran en estado de pregástrula (EGK<X) al momento de la recolección de los huevos⁸¹.

Los cambios en los componentes del huevo como el aumento en el pH del albumen, la reducción de la albúmina y la resistencia de la membrana vitelina, que se producen durante el almacenamiento no se impiden por la preincubación. Esto puede tener consecuencias sobre la protección del embrión contra los microorganismos y sobre la disponibilidad de nutrientes para el embrión durante la incubación y por lo tanto podría afectar la capacidad de eclosión, así como la calidad del pollito⁸². Teniendo en cuenta esto, se han desarrollado nuevas técnicas de incubación durante el almacenamiento, que consisten en cortos periodos de incubación después de que los huevos han iniciado su periodo de almacenamiento.

Dymond et al. en 2013, estudiaron varios tratamientos de 4 horas de preincubación cada 4 o 5 días, durante un almacenamiento de 21 días que permitieron mejorar la incubabilidad a 84%, gracias a la disminución de la MET y METa⁸³. Se observó que después de varios periodos de incubación, el desarrollo del embrión llegó a HH3⁸⁴, lo que en una única incubación pre-almacenamiento representa un fracaso, en este caso de múltiples incubaciones no lo es, ya que este estado se alcanza luego de 2 incubaciones en un periodo de 8 a 9 días de almacenamiento y con 4 incubaciones durante 19 a 20 días de almacenamiento, por lo tanto el embrión no alcanza a ser almacenado tanto tiempo en estado avanzado, como ocurre con una sola incubación, en la que se alcanza el estadio

⁸¹ REIJRINK IAM, MEIJERHOF R, KEMP B, GRAAT EAM, VAN DEN BRAND H. Op. Cit.

⁸² *Ibíd.*

⁸³ DYMOND J, VINYARD B, NICHOLSON AD, FRENCH NA, BAKST MR. Op.Cit.

⁸⁴ HAMBURGER V, HAMILTON HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 1951;88(1):49–92.

avanzado y luego se almacenan los huevos por tiempo prolongado. Probablemente, las múltiples incubaciones permiten que el sistema de reparación celular se reactive, cosa que no ocurre cuando el almacenamiento es continuo⁸⁵.

4.2.2.6 Temperatura. El embrión de pollo es poiquilotermo, por lo cuál la temperatura es un factor determinante en todas las fases de producción, transporte, almacenamiento e incubación del huevo. Durante estas, la fluctuación de la temperatura afecta el desarrollo del embrión, influencia la tasa metabólica de movilización y consumo de yema y albumen y, posteriormente, el desarrollo embrionario en la incubación⁸⁶.

Inicialmente el huevo en formación está expuesto a la temperatura de la gallina, la cual es de 41.5°C⁸⁷. Cuando es puesto, pasa a depender de la temperatura ambiental, por lo cual la temperatura del nido y el tiempo que transcurre entre la ovoposición y la recolección del huevo son críticos para el desarrollo del embrión. Fassenko et al. en 1999, expusieron huevos a altas temperaturas de verano, en el nido y en la bodega antes del almacenamiento, en diferentes lapsos de tiempo (1,5 o 6,5 horas), y encontraron que los huevos que permanecieron más tiempo a temperatura ambiente, presentaban un estado de desarrollo más avanzado que los que fueron recogidos y llevados al almacenamiento a la hora y media. Según los autores, posiblemente esta diferencia puede ser atribuida a tres aspectos: en primer lugar al mayor tiempo de exposición a las altas temperaturas de los huevos que no se llevaron rápidamente al almacenamiento para ser enfriados; en segundo lugar las temperaturas de los nidos y las bodegas fueron más altas durante la hora del día en que los huevos permanecieron 6,5 horas a temperatura ambiente, que

⁸⁵ DYMOND J, VINYARD B, NICHOLSON AD, FRENCH NA, BAKST MR. Op. Cit.

⁸⁶ DEEMING DC, FERGUSON MWJ. Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles. Cambridge University Press; 1991.

⁸⁷ YAHAV S. Regulation of body temperature: Strategies and Mechanisms. *Sturkie's Avian Physiology* [Internet]. Sexta edición. Elsevier; 2015 [citado 2015 Apr 3]. pág 739-766. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124071605000373>

cuando los huevos estuvieron 1,5 horas; y a que los huevos que permanecieron más tiempo en el nido, tuvieron mayor posibilidad de ser incubados por las gallinas. Sin embargo, a pesar de estas diferencias en el desarrollo embrionario, no se encontraron diferencias significativas en la incidencia de mortalidad embrionaria o incubabilidad en los dos grupos⁸⁸.

El tipo de nido también determina la tasa de enfriamiento del huevo. Los huevos puestos en nidos automáticos pierden más fácilmente calor, que los que son puestos en nidos con cama, lo que probablemente resulta en estados embrionarios más avanzados en estos últimos comparados con los nidos automáticos⁸⁹.

Durante la incubación, la temperatura puede tener un efecto divergente sobre el crecimiento del embrión: elevadas temperaturas al inicio puede acelerar el crecimiento del embrión y la utilización de energía de la yema y el albumen, pero a medida que los días pasan, la exposición constante a altas temperaturas disminuye el crecimiento del embrión⁹⁰, por lo tanto ha sido de gran importancia establecer que el rango de temperatura entre 37 y 38°C, es el más adecuado para optimizar la incubabilidad (generalmente entre 37.5 a 37.8°C)⁹¹.

Como la temperatura del embrión es difícil de medir sin matarlo, se ha usado la temperatura de la cáscara como indicador ya que esta no se desvía más de 0,1 a

⁸⁸ FASENKO GM, WILSON JL, ROBINSON FE, HARDIN RT. Effects of length of egg nest holding time and high environmental temperatures on prestorage embryonic development, survival, and hatchability of broiler breeders. *J appl poult res.* 1999;8(4):488–92.

⁸⁹ MEIJERHOF R. Theoretical and empirical studies on temperature and moisture loss of hatching eggs during the preincubation period [En línea]. PhD thesis. 1994 [citado 2015 Jul 27]. Disponible en: <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/599194>

⁹⁰ ROMANOFF AL, ROMANOFF AJ. Pathogenesis of the avian embryo: an analysis of causes of malformations and prenatal death. *Teratology.* 1972; 8(1): 81-82.

⁹¹ WILSON HR, TULETT SG. Physiological requirements of the developing embryo: temperature and turning. *Avian incubation.* 1990. pág 145–56.

0,2°C de la temperatura del embrión⁹². Esta medición ha permitido calcular el calor que se produce a medida que se incrementa el metabolismo del embrión. La producción de calor está influenciada por la edad del lote, el tamaño del huevo y por el estado de incubación⁹³, ya que a partir del día 9, la producción de calor por parte del embrión se incrementa exponencialmente debido a la aceleración del metabolismo⁹⁴. El calor producido debe ser transferido, para lo cual se requiere de 3 factores: la temperatura de la incubadora, la velocidad del aire y la humedad relativa⁹⁵.

Para mantener la temperatura óptima del embrión entre 37.5 y 38°C a lo largo de la incubación, se ha establecido que la incubadora debe estar un poco más alta de este rango durante los primeros 5 días, ya que el embrión en este punto tiene baja producción de calor comparado con las pérdidas por evaporación. A partir del día 9, el embrión produce más calor, que no se compensa con las pérdidas por evaporación, por lo que se recomienda ajustar la temperatura de la incubadora, para mantener al embrión en el rango adecuado de temperatura^{96,97}.

El flujo de aire es otro factor importante que determina la temperatura del embrión. Elibol y Brake en 2008, evaluaron el efecto del peso del huevo y su posición dentro de la incubadora; y encontraron que para huevos ubicados lejos del flujo de aire se incrementó la mortalidad embrionaria, y que para huevos grandes alejados

⁹² FRENCH NA. Modeling Incubation Temperature: The Effects of Incubator Design, Embryonic Development, and Egg Size. *Poult Sci.* 1997;76(1):124–33.

⁹³ LOURENS A, MOLENAAR R, VAN DEN BRAND H, HEETKAMP MJW, MEIJERHOF R, KEMP B. Effect of Egg Size on Heat Production and the Transition of Energy From Egg to Hatchling. *Poult Sci.* 2006;85(4):770–6.

⁹⁴ LOURENS A, VAN DEN BRAND H, HEETKAMP MJW, MEIJERHOF R, KEMP B. Effects of Eggshell Temperature and Oxygen Concentration on Embryo Growth and Metabolism During Incubation. *Poult Sci.* 2007;86(10):2194–9.

⁹⁵ MEIJERHOF R, VAN BEEK G. Mathematical Modelling of Temperature and Moisture Loss of Hatching Eggs. *J Theor Biol.* 1993;165(1):27–41.

⁹⁶ *Ibíd.*

⁹⁷ FRENCH NA. Modeling incubation temperature: the effects of incubator design, embryonic development, and egg size. *Poult Sci.* 1997;76(1):124–33.

del flujo de aire, la temperatura de la cáscara fue mayor. Estos resultados pudieron explicarse a partir del hecho de que la distribución o la velocidad del aire fue diferente en los puntos lejanos al flujo de aire, y esto afectó a los huevos grandes, ya que se vio disminuida su capacidad de perder calor⁹⁸.

4.2.2.7 Humedad relativa. Se recomienda que los huevos se almacenen a alta humedad relativa, entre 80 y 88%, ya que de esta manera se reduce al máximo la pérdida de agua del huevo y se logra una buena incubabilidad⁹⁹.

En incubación el rango óptimo de humedad relativa está entre 40 y 70%, obteniéndose un máximo de incubabilidad con 50%¹⁰⁰. En un estudio con embriones Arbor Acres de gallinas jóvenes, en el que compararon la mortalidad embrionaria bajo humedad relativa de 43, 53 y 63%, encontraron que la mortalidad tardía se incrementó significativamente en el último tratamiento lo que podría ser atribuido a una disminución en la presión parcial de oxígeno causado por vapor de agua adicional en el aire durante los últimos días de incubación cuando el requerimiento de O₂ es mayor¹⁰¹.

La deshidratación puede ocurrir como resultado de una baja humedad relativa durante la incubación y además la METa tiende a aumentar¹⁰².

⁹⁸ ELIBOL O, BRAKE J. Effect of egg weight and position relative to incubator fan on broiler hatchability and chick quality. *Poult Sci.* 2008;87(9):1913–8.

⁹⁹ PROUDFOOT FG, HAMILTON RMG. Care of hatching eggs before incubation. *Agriculture Canada*; 1990; pág 1-18.

¹⁰⁰ ROBERTSON IS. Studies on the effect of humidity on the hatchability of hen's eggs I. The determination of optimum humidity for incubation. *J Agric Sci.* 2009;57(02):185.

¹⁰¹ BRUZUAL JJ, PEAK SD, BRAKE J, PEEBLES ED. Effects of Relative Humidity During Incubation on Hatchability and Body Weight of Broiler Chicks from Young Breeder Flocks. *Poult Sci.* 2000;79(6):827–30.

¹⁰² VAN DER POL CW, VAN ROOVERT-REIJRINK IA, MAATJENS CM, VAN DEN BRAND H, MOLENAAR R. Op. Cit.

4.2.2.8 Oxígeno y dióxido de carbono. El O₂ es requerido durante el almacenamiento y la incubación para satisfacer la actividad enzimática que ocurre continuamente en el embrión¹⁰³, facilita la fosforilación y se difunde a lo largo de un gradiente de presión creado por el consumo de O₂ del embrión. El CO₂ y el vapor de agua se difunden en la dirección opuesta. Durante los 21 días de incubación el huevo de gallina consume aproximadamente 6L de O₂ y produce 4,5 L de CO₂, mientras que la pérdida de agua es aproximadamente constante, con una disminución durante las primeras horas de incubación posiblemente por una caída transitoria de la temperatura desde la puesta, y un aumento hacia el final de la incubación después que la cáscara es perforada¹⁰⁴.

Los tres gases principales que se ocupan de las actividades metabólicas, vapor de agua, O₂ y CO₂, se difunden a través de la cáscara de los huevos gracias a sus gradientes de presión parcial. Sin embargo, la difusión por sí sola, en el desarrollo temprano, no es suficiente para suplir el aumento en el metabolismo embrionario y se hace necesario acelerar el intercambio de O₂ y CO₂, para lo cual se forma y organiza una red de vasos en una membrana que reviste el interior de la cáscara. Por lo tanto, durante la mayoría de la incubación, el intercambio de gas en el embrión se basa en la difusión a través de la cáscara y en convección cardiovascular. En la incubación tardía, estos mecanismos ya no son suficientes para suplir la demanda metabólica cada vez mayor del embrión, e interviene la convección de gas pulmonar como un mecanismo de intercambio de gas adicional. Esto ocurre sólo cerca del final de la incubación cuando el embrión obtiene acceso al aire, por la perforación de la cámara de aire (picoteo interno) y, más tarde, al romper la cáscara (picoteo externo), se inicia la ventilación pulmonar¹⁰⁵.

¹⁰³ ROMANOFF AL, ROMANOFF AJ. The avian egg. New York : John Wiley & Sons; 1949.

¹⁰⁴ MORTOLA JP. Gas exchange in avian embryos and hatchlings. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2009;153(4):359–77.

¹⁰⁵ *Ibíd.*

Se requiere un adecuado suministro de O₂ (aproximadamente una concentración de 21%) ya que es esencial para el desarrollo de la vida de los animales aerobios al servir como aceptor final de electrones en la fosforilación oxidativa mitocondrial, y ser requerido como sustrato por parte de varios procesos enzimáticos¹⁰⁶. Molenaar et al. en 2010 estudiaron el efecto de tres concentraciones de O₂ (17, 21 o 25%), durante el día 7 al 19 de incubación, sobre la supervivencia del embrión y encontraron que el peso del cuerpo libre de yema aumentó, a mayor concentración de O₂, lo que podría indicar una baja eficiencia de utilización de nutrientes para el crecimiento en concentraciones de O₂ bajas. Además, una concentración de 17% de O₂ combinada con alta temperatura de la cáscara tuvo efecto negativo en la supervivencia y desarrollo del embrión, explicado posiblemente por la reducción en la disponibilidad de nutrientes para la eclosión, el menor desarrollo del cuerpo que no logra satisfacer la demanda de energía requerida para la eclosión y una mayor incidencia de malposiciones¹⁰⁷. Se ha reportado que como mecanismos de adaptación a bajas concentraciones de O₂, los embriones aumentan su capacidad de transporte del gas a través del incremento de los glóbulos rojos, la hemoglobina o el volumen de la sangre¹⁰⁸.

Los niveles de CO₂ que se utilizan en incubación artificial están alrededor del 0.3% para incubadoras de carga múltiple, mientras que para incubadoras de una sola carga está alrededor de 0.05% y aumenta gradualmente durante la incubación debido a la producción de CO₂ por parte de los embriones¹⁰⁹.

¹⁰⁶ WENGER RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol.* 2000;203(Pt 8):1253–63.

¹⁰⁷ MOLENAAR R, MEIJERHOF R, VAN DEN ANKER I, HEETKAMP MJW, VAN DEN BORNE JJGC, KEMP B, et al. Effect of eggshell temperature and oxygen concentration on survival rate and nutrient utilization in chicken embryos. *Poult Sci.* 2010;89(9):2010–21.

¹⁰⁸ XU LJ, MORTOLA JP. Effects of hypoxia or hyperoxia on the lung of the chick embryo. *Can J Physiol Pharmacol.* 1989;67(5):515–9.

¹⁰⁹ GILDERSLEEVE RP, BOESCHEN DP. The effects of incubator carbon dioxide level on turkey hatchability. *Poult Sci.* 1983;62(5):779–84.

La tolerancia de los embriones a CO₂ parece variar con la edad. Durante los primeros 4 días de incubación, la concentración de CO₂ puede aumentar hasta el 1% sin afectar la capacidad de eclosión¹¹⁰. Entre los días 5 y 8 de la incubación, los embriones pueden sobrevivir en concentraciones de CO₂ de hasta 3%. Es posible que esta tolerancia después de 4 días de incubación pueda ser causada por el establecimiento del sistema respiratorio hacia las 96 horas de incubación¹¹¹. Entre los días 9 y 12 de incubación, que es la etapa de desarrollo en el que la mayor tasa de crecimiento se produce en las membranas extraembrionarias, los embriones pueden sobrevivir a concentraciones de CO₂ de hasta 5%¹¹². Sin embargo, aunque las concentraciones de CO₂ de hasta el 5% no afectan negativamente a la capacidad de eclosión, es cuestionable cómo puede afectar el desarrollo embrionario.

4.2.2.9 Pérdida de agua del huevo. La pérdida de agua ocurre durante todo el proceso de almacenamiento e incubación del huevo y está relacionada con la temperatura, la humedad relativa, la duración del almacenamiento y la edad del lote¹¹³. Después de la ovoposición el huevo comienza a perder agua debido a la diferencia de presión entre el interior y el exterior del huevo a partir de dos procesos: el primero, la pérdida por difusión a través de los poros de la cáscara y el segundo, la oxidación de los lípidos de la yema la cual produce agua metabólica que es agregada al volumen total del huevo¹¹⁴. Cuando la temperatura de

¹¹⁰ TAYLOR LW, SJODIN RA, GUNNS CA. The Gaseous Environment of the Chick Embryo in Relation to Its Development and Hatchability: 1. Effect of Carbon Dioxide and Oxygen Levels during the First Four Days of Incubation upon Hatchability. *Poult Sci.* 1956;35(6):1206–15.

¹¹¹ TAYLOR LW, KREUTZIGER GO. The Gaseous Environment of the Chick Embryo in Relation to Its Development and Hatchability: 2. Effect of Carbon Dioxide and Oxygen Levels During the Period of the Fifth through the Eighth Days of Incubation. *Poult Sci.* 1965;44(1):98–106.

¹¹² *Ibíd.*

¹¹³ WALSH TJ, RIZK RE, BRAKE J. Effects of Temperature and Carbon Dioxide on Albumen Characteristics, Weight Loss, and Early Embryonic Mortality of Long Stored Hatching Eggs. *Poult Sci.* 1995;74(9):1403–10.

¹¹⁴ AR A, RAHN H. Water in the Avian Egg Overall Budget of Incubation. *American zoologist.* 1980;20(2):373–84.

incubación es constante, la tasa de producción de agua metabólica tiende a ser constante, por lo cual el proceso más importante para determinar la cantidad de agua en el huevo es la pérdida de agua por difusión a través de la cáscara¹¹⁵.

La tasa de pérdida tiene efecto en la embriogénesis e influencia la ampliación de la cámara de aire para permitir la ventilación temprana del embrión después del picoteo interno¹¹⁶. Está establecido que se encuentra una buena incubabilidad cuando la pérdida de agua es cercana al 12% a los 18 días de incubación y la mortalidad embrionaria tiende a incrementarse cuando la pérdida de agua es menor a 9,1% o mayor de 18,5%¹¹⁷.

4.2.2.10 Edad de la reproductora. Las gallinas, particularmente de la estirpe Cobb y Ross, entran en fase de producción alrededor de la semana 24 y 25 y se espera que alcancen la semana 64 o 65 con los estándares de los parámetros establecidos para cada edad^{118,119}. Pero está claro que las características de producción cambian con la edad del lote, por lo que a medida que la edad aumenta, ocurre una disminución de la producción y de la incubabilidad¹²⁰, en asociación con otros factores.

Por ejemplo, se sabe que los huevos de gallinas viejas son más sensibles al incremento de la temperatura en el nido, a periodos de almacenamiento largos, a

¹¹⁵ DAVIS TA, SHEN SS, ACKERMAN RA. Embryonic osmoregulation: Consequences of high and low water loss during incubation of the chicken egg. J Exp Zool. 1988;245(2):144-56.

¹¹⁶ AR A, RAHN H. Op. Cit.

¹¹⁷ DAVIS TA, SHEN SS, ACKERMAN RA. Op. Cit.

¹¹⁸ REPRODUCTORAS ROSS 308. Objetivos de rendimiento [En línea]. 2013. [Citado 2015-08-9]. Disponible en: http://avicol.co/descargas2/Ross-308-Reproductoras-Objetivos-de-Rendimiento-2011_SP.pdf

¹¹⁹ COMPLEMENTO PARA EL MANEJO DE REPRODUCTORAS ROSS 308 [En línea]. 2011. [Citado 2015-08-09]. Disponible en: <http://cobb-vantress.com/docs/default-source/cobb-500-guides/sf-breeder-management-supplement---Spanish.pdf>

¹²⁰ MEIJERHOF R. Op. Cit.

cualquier tratamiento de preincubación inadecuado e incluso al volteo insuficiente durante la incubación, comparados con los huevos de gallinas jóvenes, posiblemente por diferencias en la calidad del albumen¹²¹.

4.2.2.11 Nutrición de la reproductora. La dieta de las reproductoras influencia la embriogénesis e incubabilidad de los huevos. La deficiencia o exceso de ciertos nutrientes puede tener consecuencias severas sobre la viabilidad del embrión aunque algunos nutrientes pueden causar caída de la producción de huevos antes que afectar el embrión, por lo que su efecto sobre el desarrollo no se aprecia a menos que sea en condiciones experimentales; además algunas enfermedades, infecciones parasitarias, toxinas, venenos o medicamentos pueden causar problemas nutricionales e incidir sobre la incubabilidad¹²².

Peebles et al. en 1998 reportó que la adición de 3% de grasa animal a la dieta de las gallinas podía retardar el crecimiento del embrión aunque no tenía efectos posteriores sobre la incubabilidad¹²³. También se asoció la dieta a efectos en las características de la calidad interna del huevo y en la calidad de la cáscara. Se sabe que agregar grasa a la dieta altera la composición de ácidos grasos: dietas con grasas insaturadas modifican el nivel de saturación de ácidos grasos de la yema¹²⁴ y el ácido linoleico en dietas de gallinas deficientes maximiza el peso del huevo¹²⁵. Peebles et al. en 2000 también reportaron que la conductancia de la cáscara incrementó por el uso de dietas con contenido moderado de energía y

¹²¹ YAHAV S, BRAKE J. Chick Embryogenesis: A Unique Platform to Study the Effects of Environmental Factors on Embryo Development. *J Stem Cells*. 2014;9(1):17–37.

¹²² WILSON HR. Effects of maternal nutrition on hatchability. *Poult Sci*. 1997;76(1):134–43.

¹²³ PEEBLES ED, PANSKY T, DOYLE SM, BOYLE CR, SMITH TW, LATOUR MA, et al. Effects of dietary fat and eggshell cuticle removal on egg water loss and embryo growth in broiler hatching eggs. *Poult Sci*. 1998;77(10):1522–30.

¹²⁴ CRUICKSHANK EM. Studies in fat metabolism in the fowl: The composition of the egg fat and depot fat of the fowl as affected by the ingestion of large amounts of different fats. *Biochem J*. 1934;28(3):965–77.

¹²⁵ MENGE H, CALVERT CC, DENTON CA. Further studies of the effect of linoleic acid on reproduction in the hen. *J Nutr. Am Soc Nutrition*; 1965;86(2):115–9.

poca adición de grasa, mientras que la gravedad específica se incrementa con mayor saturación de grasa en la dieta¹²⁶.

Se encontró que sustancias tóxicas como las aflatoxinas al ser inoculadas en huevos embrionados, incrementan la mortalidad considerablemente y además se observan severas malformaciones como espina bífida, anoftalmia, piernas deformes y evisceración¹²⁷. También se determinó que se transfieren al ovario y a los huevos, así como a la progenie incubada, y que al administrar una dosis de 4 ppm de aflatoxina B1 a la dieta de las reproductoras, se incrementa significativamente la mortalidad embrionaria¹²⁸.

4.2.2.12 Posición y volteo del huevo. La orientación del huevo durante el almacenamiento es con el polo agudo hacia abajo, ya que normalmente el blastodermo se encuentra debajo de un cinturón ecuatorial restringido de aproximadamente 1,5 cm. Esta posición del huevo permite que el embrión se mantenga dentro de esta zona y aumenta las probabilidades de desarrollarse normalmente¹²⁹. Durante la incubación, se mantiene esta posición hasta el día 18, ya que se ha demostrado que influencia la incubabilidad porque se incrementa la proporción de embriones que tienen la cabeza localizada hacia el extremo ancho del huevo, debajo de la cámara de aire, la cuál es la posición óptima para la eclosión¹³⁰.

¹²⁶ PEEBLES ED, ZUMWALT CD, DOYLE SM, GERARD PD, LATOUR MA, BOYLE CR, et al. Effects of dietary fat type and level on broiler breeder performance. *Poult Sci.* 2000;79(5):629–39.

¹²⁷ CILIEVICI O, CORDOS I, GHIDUŞ E, MOLDOVAN A. The toxic and teratogenic effect of aflatoxin B1 on the chick embryo development. *Morphol Embryol (Bucur).* 1980;26(4):309–14.

¹²⁸ PÉREZ-ARÉVALO ML, ASCANIO E, SOTO BRACHO J, ROMÁN R, ARRIETA D, RINCÓN H. Mortalidad Embrionaria en Pollitos Causada por Aflatoxina B1 Trasmiteda Vía Transovárica. *Rev Científica.* 2007;17(3):275–9.

¹²⁹ CHRISTENSEN V. Op. Cit.

¹³⁰ OPPENHEIM RW. Prehatching and hatching behaviour in birds: A comparative study of altricial and precocial species. *Anim Behav.* 1972;20(4):644–55.

El día 18 los huevos son transferidos a la cámara de nacimientos, y ubicados en posición horizontal. En un estudio se evaluó si este cambio de posición alteraba la capacidad de eclosión de los huevos, pero no se encontraron diferencias en la incubabilidad entre las diferentes posiciones asignadas a los grupos de tratamiento en los últimos días de incubación¹³¹. Sin embargo, se sugirió que almacenar el huevo con la punta hacia arriba puede llegar a ser beneficioso¹³². Proudfoot en 1967 y 1969 encontró que cuando los huevos se almacenaban durante máximo 28 días con la punta hacia arriba, la incubabilidad mejoraba^{133,134}. En otro estudio se encontraron resultados similares, según los cuales la incubabilidad fue mayor para huevos almacenados durante 14 días con la punta hacia arriba, debido a una disminución significativa de la MET y METa, pero no ocurrió lo mismo con huevos almacenados durante 3 días¹³⁵. La mejor incubabilidad en estos casos podría estar relacionada con la posición más centralizada de la yema y la localización del blastodermo en la región ecuatorial del huevo^{136,137}.

Olsen en 1930 observó que en la incubación natural, la gallina mueve sus huevos alrededor de 96 veces por día¹³⁸ y a partir de esto se ha buscado establecer la importancia del volteo y la frecuencia más adecuada en incubación artificial. Se

¹³¹ VAN DE VEN L J F, BALLER L, VAN WAGENBERG A V, KEMP B, VAN DEN BRAND H. Op. Cit.

¹³² MAYES F J, TAKEBALLI M A. Storage of the Eggs of the Fowl (*Gallus domesticus*) before Incubation: A Review. *Worlds Poult Sci J.* 1984;40(2):131.

¹³³ PROUDFOOT F G. Advance note on the hatchability of chicken eggs stored small end up. *Can J Anim Sci.* 1967;47(2):142–3.

¹³⁴ PROUDFOOT F G. Effect of packing orientation, daily positional change and vibration on the hatchability of chicken eggs stored up to four weeks. *Can J Anim Sci.* 1969;49(1):29–35.

¹³⁵ ELIBOL O, BRAKE J. Effect of egg position during three and fourteen days of storage and turning frequency during subsequent incubation on hatchability of broiler hatching eggs. *Poult Sci.* 2008;87(6):1237–41.

¹³⁶ PROUDFOOT F G. Op. Cit.

¹³⁷ GUÍO M, BRIÑEZ J, AMADO J, MARTÍNEZ A. Efecto del almacenamiento de huevo incubable con la cámara de aire hacia abajo, sobre la incubabilidad, según la edad de las reproductoras, para tres días de rotación. *Revista Ciencia Animal.* 2011;(4): 89–96.

¹³⁸ LANDAUER W. The hatchability of chicken eggs as influenced by environment and heredity. *Monogr Storrs agric Exp Stn Univ Conn.* 1967;(1).

observó que el volteo es esencial para el desarrollo óptimo de las membranas embrionarias, la orientación correcta del embrión en el huevo antes de la eclosión¹³⁹, la prevención de adhesión anormal de el embrión o las membranas embrionarias a la membrana de la cáscara¹⁴⁰ y también, para estimular el uso de la albúmina por parte del embrión y por consiguiente influenciar la tasa de crecimiento del mismo, reflejada en un desarrollo más avanzado de los huevos que se voltean¹⁴¹. Así mismo, se reportó que la máxima incubabilidad se logra con un volteo de 96 veces diarias, aunque se demostró que 24 veces son suficientes para mantener una buena incubabilidad por lo cual, en la práctica, las incubadoras normalmente voltean los huevos cada hora¹⁴².

Otro aspecto importante ha sido determinar en que momento de la incubación y por que mecanismo, el volteo de los huevos mejora la incubabilidad. En un estudio se observó que voltear los huevos 96 veces por día comparado con 24 o 48 veces, durante los días 3 al 11 de incubación, mejoró la incubabilidad significativamente debido a la reducción de la METa¹⁴³. Este tipo de mortalidad probablemente puede ocurrir por un retraso en el desarrollo de la membrana corioalantoidea cuando los huevos no se voltean adecuadamente¹⁴⁴. Por otro lado, cuando la falla del volteo es entre el día 0 y 2 de incubación, hay un incremento de la MET¹⁴⁵. Adicionalmente es posible que la respuesta a la frecuencia de volteo dependa de

¹³⁹ ROBERTSON IS. The influence of turning on the hatchability of hens' eggs II. The effect of turning frequency on the pattern of mortality, the incidence of malpositions, malformations and dead embryos with no somatic abnormality. *J Agric Sci.* 1961;57(01):57-69

¹⁴⁰ NEW DAT. A Critical Period for the Turning of Hens' Eggs. *J Embryol Exp Morphol.* 1957;5(3):293-9.

¹⁴¹ TONA K, ONAGBESAN O, DE KETELAERE B, DECUYPERE E, BRUGGEMAN V. Effects of turning duration during incubation on corticosterone and thyroid hormone levels, gas pressures in air cell, chick quality, and juvenile growth. *Poult Sci.* 2003;82(12):1974-9.

¹⁴² WILSON HR, TULETT SG. *Op. Cit.*

¹⁴³ ELIBOL O, BRAKE J. Effect of frequency of turning from three to eleven days of incubation on hatchability of broiler hatching eggs. *Poult Sci.* 2003;82(3):357-9.

¹⁴⁴ DEEMING DC. Characteristics of unturned eggs: critical period, retarded embryonic growth and poor albumen utilisation. *Br Poult Sci.* 1989;30(2):239-49.

¹⁴⁵ ELIBOL O, BRAKE J. Identification of critical periods for turning broiler hatching eggs during incubation. *Br Poult Sci.* 2004;45(5):631-7.

la calidad del huevo, ya que huevos de gallinas viejas (asociados a pobre calidad) exhibieron una mejor incubabilidad al incrementar la frecuencia de volteo, lo que puede ser atribuido a diferencias en el albumen y la calidad de la cáscara relacionadas con la edad del lote¹⁴⁶.

Además de la frecuencia, es importante tener en cuenta el ángulo de volteo, para el que se ha propuesto 45° como el más adecuado. En un experimento, Elibol y Braket en 2006, compararon diferentes ángulos y frecuencias de volteo y encontraron que aunque no hubo diferencias en incubabilidad o mortalidad embrionaria, la incidencia de malposiciones se incremento por un reducido ángulo (35°), pero esto mejoró con el incremento concomitante de la frecuencia de volteo¹⁴⁷.

4.2.2.13 Malposición del embrión. La posición normal para nacer es con la columna vertebral paralela al eje longitudinal del huevo y con el pico debajo del ala derecha. La punta del pico se dirige hacia la cámara de aire, en el polo romo del huevo. Cuando el pico está debajo del ala derecha, ésta mantiene la membrana del cascarón alejada de la cara del embrión, lo que le da al pico más libertad de movimiento. Además, el ala ayuda a estirar la membrana interna del cascarón, facilitando el trabajo del pico para romperla. De esta manera, el embrión logra tener acceso a la cámara de aire y comienza a ventilar los pulmones¹⁴⁸. Cuando el embrión no alcanza a adoptar esta posición antes del momento de la eclosión, se dice que ocurrió una malposición.

¹⁴⁶ BRAKE J, WALSH TJ, BENTON CE, PETITTE JN, MEIJERHOF R, PENALVA G. Egg handling and storage. *Poult Sci.* 1997;76(1):144–51.

¹⁴⁷ ELIBOL O, BRAKE J. Effect of Egg Turning Angle and Frequency During Incubation on Hatchability and Incidence of Unhatched Broiler Embryos with Head in the Small End of the Egg. *Poult Sci.* 2006;85(8):1433–7.

¹⁴⁸ TULLETT S. Op. Cit.

Basado en estudios de Sanctuary¹⁴⁹, Hutt¹⁵⁰ y Smith¹⁵¹, se estableció la clasificación de las malposiciones más comunes de la siguiente manera:

- I. Cabeza entre los muslos
- II. Cabeza en la punta del huevo
- III. Cabeza por encima o por debajo del ala izquierda
- IV. Embrión rotado con la cabeza lejos de la cámara de aire
- V. Patas sobre la cabeza
- VI. Pico sobre el ala derecha

Figura 4: Posiciones al momento de la eclosión



1. Posición normal. 2. Cabeza entre los muslos. 3. Cabeza en la punta del huevo.
4. Cabeza volteada a la izquierda. 5. Pico alejado de la cámara de aire. 6. Patas

¹⁴⁹ SANCTUARY WC. One Cause of Dead Chicks in the Shell. *Poult Sci.* 1925;4(4):141–3.

¹⁵⁰ HUTT FB. X. Studies in Embryonic Mortality in the Fowl. I. The Frequencies of Various Malpositions of the Chick Embryo and their Significance. *Proc R Soc Edinburgh.* 1930;49:118–30.

¹⁵¹ SMITH JB. Malpositions: a factor in hatchability. *Proc 22nd Ann Meet Poul Sci Assoc.* 1930;66–71.

sobre la cabeza. Modificado de: Cómo investigar las prácticas de incubación. Ross tech. Avicol. 2009.

4.2.2.14 Contaminación microbiana. La infección microbiana durante la preincubación ha sido estudiada como una importante causa de disminución de la viabilidad embrionaria. La cáscara alberga microorganismos desde poco después de la postura, y en condiciones ambientales adecuadas pueden multiplicarse rápidamente, penetrar a través de los poros de la cáscara, infectar el contenido del huevo y causar mortalidad embrionaria¹⁵². En un experimento se infectaron huevos a los 18 días de incubación con una cepa de E. Coli, lo que causó un incremento significativo de la muerte del embrión en la cáscara siendo del 22% para los huevos tratados, comparados con 2,9% de los controles. Cuando se infectaron huevos el primer día, los embriones sobrevivieron en la incubación, pero se incrementó la mortalidad de 1,8% a 8,2% durante los primeros 9 días siguientes a la eclosión¹⁵³.

Si bien hasta ahora se han dado los elementos biológicos del tema, el interés principal de este estudio es en un nivel poblacional o ecológico, en el que la ocurrencia masiva de los eventos dentro de una población corresponden al foco de interés. Esto resulta supremamente relevante, porque corresponde a la visión de interés para el productor de pollos de engorde, que debido a su interés económico no puede enfocarse a la comprensión exclusivamente biológica del tema. A continuación se hará referencia a aspectos teóricos del diseño de estudio elegido.

¹⁵² COOK MI, BEISSINGER SR, TORANZOS GA, ARENDT WJ. Incubation reduces microbial growth on eggshells and the opportunity for trans-shell infection. *Ecol Lett.* 2005;8(5):532–7.

¹⁵³ REID WM, MAAG TA, BOYD FM, KLECKNER AL, SCHMITTLE SC. Embryo and Baby Chick Mortality and Morbidity Induced by a Strain of Escherichia Coli. *Poult Sci.* 1961;40(6):1497–502.

4.3 ESTUDIOS ECOLÓGICOS

Este diseño de estudio se centra en la comparación de grupos, más que en la de individuos¹⁵⁴. La consecuencia de este enfoque es que por emplear promedios grupales, frecuentemente se desconoce la distribución conjunta de las características en estudio de cada individuo¹⁵⁵.

La principal razón para usar un diseño de este tipo es el interés de evaluar un efecto ecológico, lo cual es especialmente relevante cuando se va a evaluar el impacto de intervenciones a nivel poblacional¹⁵⁶. Adicionalmente, la fácil disponibilidad de los datos que por lo general se extraen de registros rutinarios con propósitos administrativos o legales, permite llevarlos a cabo fácilmente. Otra, es que la comparación entre diversas áreas permite la evaluación de múltiples niveles de exposición, lo cual puede ser imposible en una sola área geográfica cuando se tienen exposiciones casi homogéneas¹⁵⁷. En el caso específico de este estudio, la dispersión de las granjas en los tres municipios permitirá, por ejemplo, medir el efecto de variables ambientales como la temperatura de la zona, la humedad relativa o la altitud, lo que no se podría evaluar si se realizara un estudio individual en una sola granja. Además, tienden a ser estudios de bajo costo, útiles cuando existen limitaciones para realizar medición de variables individuales, y simples en relación al análisis y la presentación de los resultados¹⁵⁸.

4.3.1 Niveles de medición. Las medidas ecológicas pueden ser clasificadas en tres tipos:

¹⁵⁴ MORGENSTERN H. Ecologic studies in epidemiology: concepts, principles, and methods. *Annu Rev Public Health*. 1995;16:61–81.

¹⁵⁵ BORJA-ABURTO, V. H.. Estudios ecológicos. *Salud Pública de México*, 2000;42(6): 533-538.

¹⁵⁶ MORGENSTERN H. Op. Cit.

¹⁵⁷ BORJA-ABURTO, V. H.. Op. Cit.

¹⁵⁸ MORGENSTERN H. Op. Cit.

- Medidas agregadas: son resúmenes de observaciones derivadas de los individuos en cada grupo dadas en promedios y proporciones. En este estudio, la variable dependiente será medida de esta manera, es decir, la incidencia de mortalidad embrionaria para cada grupo de huevos será la principal variable representante de este tipo de medición¹⁵⁹.
- Medidas ambientales: representan las características físicas del lugar en el cual los miembros del grupo viven. Cada variable medida de esta manera tiene una análoga a nivel individual, que puede variar entre los miembros de cada grupo pero que no se mide¹⁶⁰. Como ejemplo para este tipo de variables se tendrá la temperatura de la granja, que tiene como análoga a nivel individual la temperatura del huevo, la cual no será medida.
- Medidas globales: son atributos de grupos o lugares para los cuales no hay análogo a nivel individual¹⁶¹.

4.3.2 Niveles de análisis. La unidad de análisis es el nivel común para el cual los datos de todas las variables serán reducidos y analizados¹⁶². En este estudio el valor de cada variable será asignado a un grupo de huevos, que estarán caracterizados por provenir del mismo galpón. Existen tres tipos de análisis:

- Completamente ecológico: todas las medidas de las variables son ecológicas, por lo cual la unidad de análisis es el grupo, lo que impide conocer la distribución de

¹⁵⁹ Ibíd.

¹⁶⁰ Ibíd.

¹⁶¹ Ibíd.

¹⁶² Ibíd.

cualquier combinación de variables a nivel individual¹⁶³. A este tipo corresponde al análisis que se llevará a cabo en el presente estudio.

- Parcialmente ecológico: se cuenta con información adicional sobre la distribución conjunta de tres o más variables, pero no se conoce completamente la distribución de todas las variables de cada grupo¹⁶⁴.
- Análisis Multinivel: es un tipo especial de técnicas de modelamiento que combina el análisis conducido en dos o más niveles. Por ejemplo, se puede realizar un análisis individual de variables dentro del grupo y a continuación, un análisis ecológico de todos los grupos usando los resultados del análisis individual¹⁶⁵.

4.3.3 Niveles de inferencia. El objetivo principal de un estudio epidemiológico es hacer inferencias, las cuales pueden ser de tres tipos¹⁶⁶:

- Efecto biológico: busca realizar inferencias de efectos sobre riesgos individuales.
- Efecto ecológico: hace inferencias de efectos sobre promedios o proporciones de grupos. La validez de la estimación de un efecto ecológico depende de la habilidad de controlar por diferencias entre grupos en la distribución conjunta de confusores.
- Efecto contextual: busca realizar inferencias del efecto de una exposición ecológica sobre el riesgo individual.

¹⁶³ Ibíd.

¹⁶⁴ Ibíd..

¹⁶⁵ Ibíd.

¹⁶⁶ Ibíd.

Para este estudio el interés recae sobre los efectos ecológicos de diferentes exposiciones sobre la incidencia de mortalidad embrionaria en cada uno de los grupos de huevos. Es importante tener en cuenta estos niveles de inferencia ya que al cruzar de uno a otro el estudio resulta vulnerable a sesgos, como se discutirá más adelante.

4.3.4 Tipos de diseño. Los diseños ecológicos pueden ser clasificados en dos dimensiones¹⁶⁷:

4.4.4.1 Según método de medición de la exposición. Pueden ser:

- Exploratorios: si la exposición de interés no está medida. Su objetivo es la búsqueda de patrones en la distribución de la morbilidad (incidencia o prevalencia) o de la mortalidad, que sugieran hipótesis etiológicas¹⁶⁸.
- Analíticos: si la variable de exposición está medida y se incluye en el análisis. Generalmente analizan hipótesis de asociación entre exposiciones ambientales y eventos en salud, por lo cual se suelen utilizar análisis estadísticos más avanzados, como las regresiones múltiples, para ajustar las asociaciones según variables de confusión¹⁶⁹.

4.3.4.2 Según método de agrupación. Pueden ser:

- Diseño de múltiples grupos: cuando los grupos son identificados por lugar.

¹⁶⁷ Ibíd.

¹⁶⁸ BLANCO-BECERRA LC, PINZÓN-FLÓREZ CE, IDROVO ÁJ. Estudios ecológicos en salud ambiental: más allá de la epidemiología. *Biomédica*. 2015;35:191.

¹⁶⁹ Ibíd.

- Diseño de series de tiempo: cuando los grupos son identificados por tiempo.
- Diseño mixto: cuando los grupos son identificados por lugar y tiempo.

Para efecto de este estudio se elegirá un diseño analítico de múltiples grupos ya que se evaluará la asociación entre el cambio en el nivel promedio de la exposición y el cambio en las tasas de enfermedad entre diferentes grupos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio observacional de tipo ecológico, analítico y mixto en una incubadora de una empresa en Santander.

5.2 POBLACIÓN

5.2.1 Población blanco. Grupos de reproductoras Ross 308 y Cobb 500, productoras de huevos para incubación de pollo de engorde en zonas con características similares a las de la región de estudio y en condiciones de granja e incubación similares a las de la empresa evaluada.

5.2.2 Población de estudio. Galpones de reproductoras Ross 308 y Cobb 500 entre 25 y 64 semanas de edad, productores de huevos para incubación de pollo de engorde, en granjas de la zona de Lebrija, Piedecuesta y Los Santos e incubados en una incubadora de Floridablanca durante los meses de noviembre de 2015 a abril de 2016.

En Colombia, la mayoría de avícolas son empresas familiares tradicionales: solo existen 4 o 5 de gran tamaño, 10 a 12 medianas y las demás son pequeñas. Las compañías grandes no alcanzan a cubrir el 40% del mercado. Sin embargo, la empresa en la que se realizará el trabajo cuenta con cerca de 50 años de experiencia y es la productora de pollo de engorde más grande de Colombia.

Produce aproximadamente el 17% de los pollos de 1 día que son enviados a cría, levante y engorde; y abarca el 20% del mercado nacional del producto final¹⁷⁰.

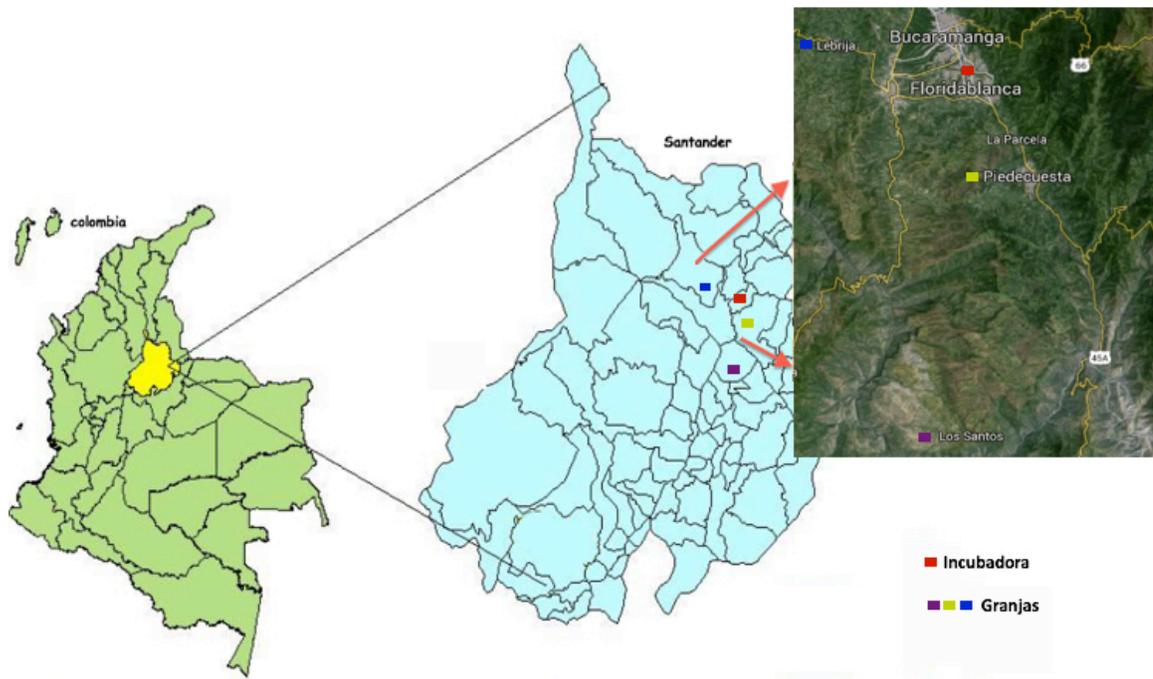
Esta empresa tiene como misión producir y comercializar proteína cuyo origen es el pollo, en forma altamente eficiente y rentable, que satisfaga plenamente las necesidades de los consumidores, con las mejores alternativas, los más exigentes estándares de calidad, a los mejores precios, logrando que cada vez más personas accedan a una mejor nutrición, respetando el medio ambiente y generando el compromiso, crecimiento y bienestar del recurso humano¹⁷¹.

Lebrija, Floridablanca, Piedecuesta y Los Santos, donde se encuentran las granjas de reproductoras de la empresa, son municipios del departamento de Santander ubicados sobre la cordillera oriental, la cual genera un sinnúmero de valles, montañas y otros accidentes geográficos y hace que a pesar de que las cabeceras municipales se encuentran entre 925 y 1310 msnm, la zona rural esté distribuida en una amplia variedad de pisos térmicos con diversidad de climas dentro de los cuales predominan el cálido y templado con temperaturas que oscilan entre 15 y 32°C (23°C en promedio), humedad relativa entre 70 y 90%, y periodos secos y lluviosos más o menos definidos.

¹⁷⁰ OPERADORA AVÍCOLA: CONSOLIDACIÓN DEL MERCADO COLOMBIANO DE POLLO. Rev ind avíc. [En línea]. 2015 [Citado 2016-02-15]; 62(10):10. Disponible en: <http://www.industriaavicola-digital.com/201510#&pageSet=6>

¹⁷¹ MACPOLLO. Misión y visión. [En Línea]. [Citado 2016-02-15]. Disponible en: <http://macpollo123.blogspot.com.co/p/mision-y-vision.html>

Figura 5: Ubicación geográfica de los municipios donde hay presencia de granjas de la empresa y ubicación de la incubadora



Modificado de: Google Maps

Los municipios de Lebrija y Los Santos dependen principalmente de la economía primaria representada por algunos cultivos de frutas y hortalizas y actividades pecuarias entre las que se destaca la avicultura. Piedecuesta y Floridablanca son municipios más urbanizados que dependen principalmente de actividades de industria, pero aun así, se en la actualidad conservan áreas dedicadas a actividades relacionadas con algunos sectores de la avicultura.

5.2.3 Unidad de análisis. Se consideró como unidad de análisis el grupo de huevos provenientes de un galpón de un lote de reproductoras.

Figura 6: Esquema general de una granja avícola

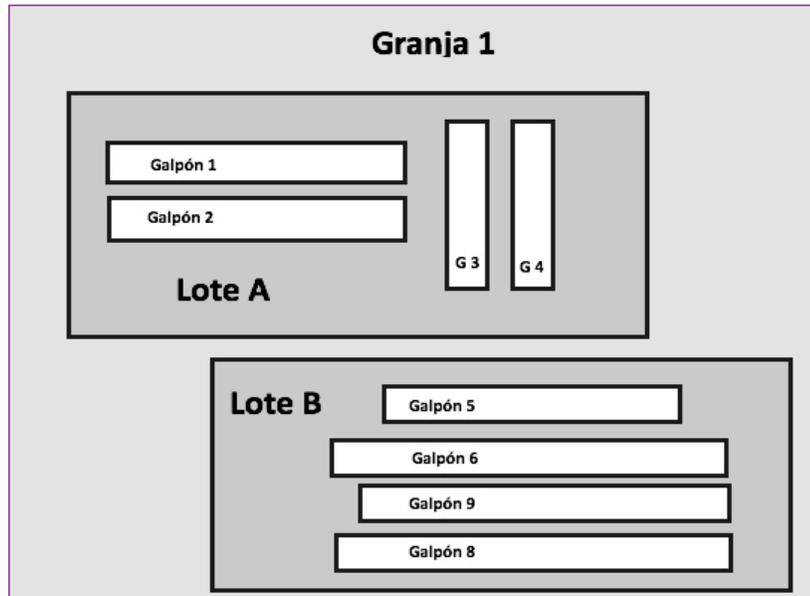


Diagrama para ilustrar la unidad de análisis.

Este estudio se llevó a cabo en dos fases:

- La primera fue un estudio de factores asociados a la incidencia de mortalidad embrionaria. Los datos de las diferentes variables para esta parte del estudio, tanto de exposición como de resultado, se obtendrán de fuentes secundarias suministradas por la empresa.
- La segunda fue un estudio en campo de seguimiento a cuatro grupos de huevos provenientes de reproductoras para evaluar la incidencia de mortalidad embrionaria según la descripción propuesta por Hamilton y Hamburger y cuya finalidad será validar los datos de mortalidad obtenidos en las mediciones ecológicas de la fase anterior.

A continuación se presentan las dos partes por separado.

6. METODOLOGÍA PARA ESTUDIO DE FACTORES DE RIESGO

6.1 CENSO

La empresa realiza embriodiagnóstico de los galpones que nacen cada día y lo registra en una base de datos. Por este motivo no se realizará muestreo ya que se contará con los datos de mortalidad de todos los galpones de reproductoras que conforman la población y a su vez, del seguimiento en el tiempo de cada uno de estos grupos.

6.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Grupos de huevos de gallinas entre 25 y 64 semanas de edad.
- Grupos de huevos de gallinas Ross 308 y Cobb 500.

6.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Ninguno

6.4 CAPTACIÓN Y SEGUIMIENTO

6.4.1 Manejo de las reproductoras. Cada grupo de reproductoras se recibe de 1 día de edad y permanece en la misma granja hasta su sacrificio. Todos los lotes en cría y levante se manejan según las recomendaciones de la casa de abuelas que produce las reproductoras. El plan nutricional y de vacunación esta estandarizado para todas las granjas según los requerimientos de la zona. El plan de oscurecimiento y el apareamiento de machos y hembras también se realiza según recomendación de la casa comercial. Además, se cumple un plan de bioseguridad común para todas las granjas.

Las aves pasan a etapa de producción cuando alcanzan el 5% de ella, alrededor de la semana 25. Se llevan a cabo varias recolecciones diarias según la etapa de producción en la que se encuentran las gallinas y se hace una clasificación inicial del huevo, en la cuál se descarta el huevo roto o muy sucio, que no es apto para incubación.

En las granjas hay dos formas de desinfección: la primera es la desinfección húmeda, con una dilución de amonio cuaternario a razón de 5 ml por litro en forma de aspersión. La segunda forma es con gas de formol, a razón de 4 ml por litro, en un cuarto sellado herméticamente. Esta desinfección en seco se realiza en huevos con cáscara completamente limpia en las bodegas donde hay cabinas de desinfección, de lo contrario, se realiza desinfección húmeda a todos los huevos que van a la incubadora, sin excepción.

No hay cuarto frío en ninguna de las granjas. Los huevos son transportados todos los días a la incubadora, por lo cual no alcanzan a durar más de 24 horas en la granja. Para su transporte se usan camiones cubiertos pero sin control de ambiente, que recogen el huevo en la mañana o en la tarde, para evitar someter a los huevos a las temperaturas más altas del día durante el trayecto.

Los huevos llegan a la incubadora, y allí se realiza una última clasificación, para descartar aquellos que hayan sufrido traumatismos durante el viaje, o que no sean aptos para incubar porque su superficie está en mal estado y no se detectaron en la granja. Los huevos se almacenan, según fecha de recepción, lote y galpón de procedencia, en el cuarto frío, a una temperatura entre 19 y 20 °C, y permanecen allí algunos días, dependiendo la programación de incubación y la disponibilidad de incubadoras.

Antes de entrar a incubación, los huevos se sacan del cuarto frío 12 horas antes y se dejan a temperatura ambiente. Posteriormente, los huevos se incuban en maquinas Chick Master de etapa múltiple con capacidad para 87.480 y 95.040 huevos y volteo automático cada hora. Las máquinas están divididas en tres salas destinadas a edades específicas de los lotes y se cargan intercaladas, cada 3 días, de lunes a sábado. La temperatura establecida para las máquinas es de 99,5°F y 50% de humedad relativa. Los huevos permanecen en las incubadoras hasta el día 18. De allí, son transferidos a las bandejas de nacimiento hasta la eclosión de los pollos, a una temperatura de 98,5°F.

Todo este proceso es realizado por personal capacitado en prácticas de incubación, y supervisado por el médico veterinario de planta.

6.4.2 Recolección de información. Se contó con tres fuentes de datos para recolectar la información de las variables de exposición y de resultado:

1. Consolidado de embriodiagnos. Es un formato en Excel generado por el médico veterinario de la incubadora a partir de la embriodiagnos realizada el día 21 de incubación a los grupos que nacen cada día. Para el embriodiagnóstico se seleccionan 3 bandejas (una de la parte superior, una de la parte media y una de la parte inferior de la máquina de nacimiento) y se evalúan los huevos que no eclosionaron. Se abren cuidadosamente por el polo ancho y se extrae el contenido para determinar aproximadamente que día murieron los embriones.

El formato identifica cada grupo de huevos con su respectivo lote y granja de procedencia; el día que entraron a la incubadora y el día del embriodiagnóstico; la edad y estirpe de las reproductoras; cuantos huevos se evaluaron en total; y la frecuencia absoluta y relativa de cada etapa de mortalidad embrionaria, huevos picados que no nacieron, huevos contaminados con hongos o bacterias, huevos fisurados y embriones con malformaciones y malposiciones

2. *Formato de registro de reproductoras por lote.* Es un formato de Excel generado por el médico veterinario encargado de cada una de las granjas, donde se registra diariamente la producción de huevos por galpón, el consumo alimento, el saldo de aves y los indicadores semanales de peso del huevo y peso de las aves.

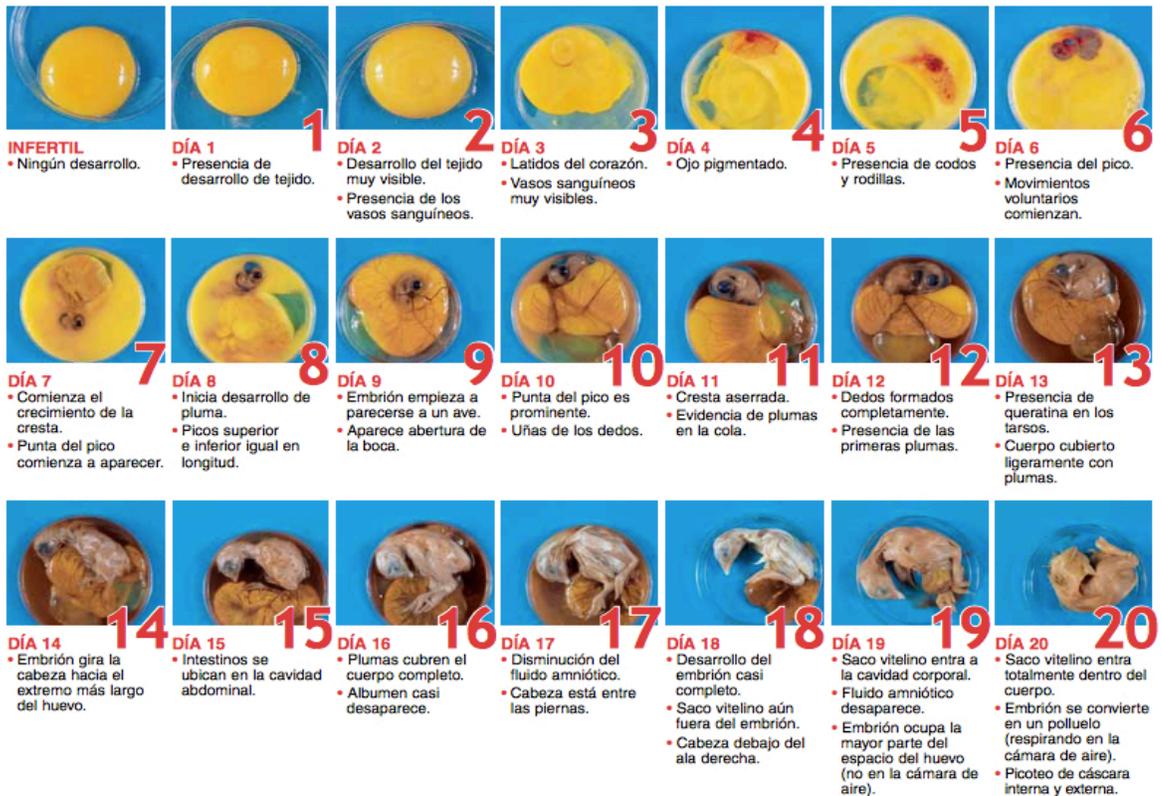
3. *Formato de información del galpón.* Se realizó una encuesta al médico veterinario encargado de cada una de las granjas, para recolectar los datos relacionados con las características del galpón de procedencia de cada grupo de huevos.

6.5 VARIABLES

6.5.1 Variable dependiente. La variable dependiente fue la tasa de mortalidad embrionaria determinada por el método de embriodiagnóstico. Se evaluó de dos formas: como mortalidad total y discriminada por etapas según el desarrollo diario del embrión (mortalidad temprana, intermedia y tardía).

Como se presentó en el marco teórico, la mortalidad embrionaria temprana (MET) va del día 1 al 7 de incubación, la intermedia (MEI) de 8 a 14 días y la tardía (METa) de 15 a 21 días, sin embargo, debido al manejo de los datos en las incubadoras, se reclasificó la mortalidad y se consideró temprana entre del día 1 al 4, intermedia del día 5 al 11 y tardía del día 12 hasta el final de la incubación.

Figura 7: Desarrollo diario del embrión de pollo



Tomado de: Guía de manejo de la incubadora. Cobb-vantress.com

6.5.2 Variables independientes. Se consideró el efecto de la temperatura de la granja de origen, teniendo en cuenta que a causa de la geografía de la zona, el clima varía de una granja a otra. La variable será dicotómica y se considerará un galpón expuesto aquel que registre una temperatura promedio mayor a 28°C.

La variable contaminación hizo referencia a huevos que a simple vista presentaron alteración del contenido, además de un olor fétido característico. Durante el embriodiagnóstico, se detectaron huevos que presentaron estos cambios y se calculó la proporción. La variable se usó en forma continua, o se dicotomizó cuando fue necesario tomando como punto de corte el sugerido por la guía (0,5%). Grupos con proporción mayor a este valor se consideraron expuestos.

La variable método de desinfección indicó si el galpón cuenta con las dos opciones de desinfección: húmeda o seca, o si por el contrario solo se realiza la húmeda. Se consideró expuesto el grupo que solo realizó desinfección húmeda.

Adicionalmente, la estirpe se usó como variable proxy para medir el efecto de la genética en la tasa de mortalidad. Se consideró la estirpe Ross 308 como el grupo expuesto.

6.5.3 Variables del galpón y la granja. Hacen referencia a las características específicas del galpón del cual provienen los diferentes grupos de huevos. Algunas variables incluidas son: municipio de donde proviene, capacidad del galpón, número de trabajadores a cargo del galpón, veterinario encargado, distancia de la granja a la incubadora, edad de las reproductoras, porcentaje de mortalidad de las reproductoras el día de la postura, entre otras especificadas en la tabla de operacionalización de variables.

6.5.4 Variables del grupo de huevos en granja e incubación. Hacen referencia a la producción del día, los huevos descartados en granja y a la llegada de la granja, la cantidad de días de almacenamiento, la incubadora a la que ingresa el grupo de huevos, el porcentaje de huevos con malposiciones o malformaciones. Otras variables de interés y posible fuente de confusión se definen en la tabla de operacionalización.

6.6 ANÁLISIS

6.6.1 Procesamiento de la información. La base de datos fue creada a partir de la información digitada en el programa Excel. Cada observación correspondió a un galpón y las variables relacionadas con cada una fueron fusionadas en una base de datos a partir de los tres formatos originales. El procesamiento y el análisis estadístico del presente protocolo se realizó en el programa STATA® 12.

6.6.2 Análisis estadístico. Se realizó un análisis descriptivo, presentando la proporción con su respectivo intervalo de confianza, para las variables categóricas y para las variables continuas, mediana y rango intercuartílico. Para evaluar diferencias significativas entre grupos, se utilizó la prueba de ji cuadrado para variables categóricas y la prueba de Kruskal-Wallis o la de Mann-Whitney para las variables continuas.

Dado que la variable dependiente fue un conteo, se tuvo en cuenta el modelo de regresión multinivel de Poisson con efectos mixtos como primera alternativa para evaluar la asociación entre la tasa de ME en las diferentes etapas y las variables independientes. Como segunda opción se propuso el modelo multinivel de regresión binomial negativa con efectos mixtos en caso de que los datos presentaran sobredispersión; esto se definió a partir de la prueba de bondad de ajuste, la prueba de la varianza y la prueba asintótica para evaluación del supuesto de distribución de Poisson de los datos, en las cuál se rechazó la hipótesis nula.

Se tuvo en cuenta también la estructura jerárquica de los datos de los galpones, los cuales están agrupados en lotes y estos a su vez en granjas, por lo cual se consideró realizar un análisis multinivel. Para definir esto, se estimaron primero modelos binomiales negativos nulos con efectos aleatorios para cada etapa de mortalidad, primero a nivel de galpón y luego a nivel de lote y se obtuvo el

cociente de máxima verosimilitud de cada modelo comparado con un modelo binomial negativo estándar.

Se ajustó para cada etapa de mortalidad un modelo binomial negativo con efectos aleatorios, tanto a nivel de galpón como a nivel de lote, y cada uno de comparó con un modelo binomial negativo estándar usando la prueba de cociente de verosimilitudes.

Posteriormente, se ajustó para cada etapa de mortalidad un modelo binomial negativo de efectos aleatorios a nivel galpón con efectos fijos en granja y se comparó con un modelo equivalente de efectos fijos en ambos niveles por medio del test de Hausman. En caso de encontrar diferencias significativas ($p < 0,05$) se seleccionó el modelo de efectos fijos, mientras que en caso contrario, se mantuvo el modelo de efectos aleatorios ya que este es más eficiente por tener menor varianza de los estimadores. Igualmente se ajustó un modelo de efectos aleatorios a nivel lote con efectos fijos en granja y su equivalente con solo efectos fijos en ambos niveles y se comparó con la misma prueba.

El modelo final para cada etapa de mortalidad se ajustó con una regresión binomial negativa con efectos aleatorios a nivel galpón y con efectos fijos a nivel lote y granja. Permanecieron en el modelo las variables principales con nivel de significancia $< 0,05$ y las interacciones con $p < 0,10$.

De acuerdo con el resultado de estas pruebas, se definió como modelo definitivo el binomial negativo multinivel de efectos mixtos. Se realizó un análisis bivariado, para determinar la asociación entre las diferentes variables independientes de interés con la tasa de ME para cada etapa y así obtener la razón de tasa cruda. Las variables con $p < 0,20$, o que tuvieron sentido teórico (independiente de lo anterior), se incluyeron en el modelo múltiple y se usó la metodología de selección con propósito para su ingreso.

La unidad más inferior de análisis fue la medición (observación) en cada galpón en distintos momentos del tiempo. Aunque las observaciones de un mismo galpón, tienen observaciones repetidas (más de un reporte de embriodiagnóstico), los huevos susceptibles son diferentes (corresponden a la observación realizada a los huevos de un mismo galpón pero en diferentes días de postura a lo largo de la vida productiva de los grupos de reproductoras); sin embargo, la correlación potencial que podría tener por ser del mismo galón, fue incorporada en el modelo.

La especificación del modelo final fue:

$$\text{Ln}(\mu_{hijm} | \beta_{o_{ijm}}, X_{hijm}) = \beta_{o_{ijm}} + \beta_k x_{hijm} + \lambda_h$$

donde μ son los embriones muertos esperados en cada observación h dentro del galpón i del lote j , de cada granja m . λ_h representa el número de huevos fértiles de cada observación h , susceptibles a sufrir ME en cada una de las etapas de la incubación dentro galpón i del lote j , de cada granja m . Adicionalmente, $\beta_k x_{hijm}$ es el vector de las k variables independientes de cada observación en cada galpón.

Además, $\beta_{o_{ijm}}$ fue el intercepto de cada galpón i , el cual varía aleatoriamente entre galpón de acuerdo a un intercepto común $\delta_{o_{jm}}$ para cada lote de una misma granja, dado el modelo:

$$\beta_{o_{ijm}} = \delta_{o_{jm}} + \delta_l x_{ijm} + \psi$$

donde $\delta_{o_{jm}}$ es el intercepto común para los galpones de un mismo lote j ; por su parte, $\delta_l x_{ijm}$ es el vector de l variables independientes, observadas y no observadas, de cada galpón i que no cambian en cada observación de un mismo galpón; y ψ es el error aleatorio asociado.

Finalmente, el intercepto δo_{jm} de cada lote, estaría dado por el modelo:

$$\delta o_{jm} = \delta o_m + \delta_g x_{jm} + \gamma$$

Donde δo_{jm} variaría aleatoriamente, en torno a δo_m que es el intercepto común para cada granja a la que pertenece un lote; este intercepto es fijo, por lo tanto no varía aleatoriamente, sino que tiene un valor estimado para cada una de las 14 granjas. Por su parte $\delta_g x_{jm}$ es el vector de las variables independientes g del lote j , y γ el término de error aleatorio asociado.

Como potenciales variables confusoras (que cambien en más de 10% el coeficiente estimado con respecto al crudo obtenido en el análisis bivariado) se incluyeron temperatura de la granja, granja de procedencia, zona, días de almacenamiento, edad de las reproductoras, huevo descartado, huevo fisurado, porcentaje de mortalidad de las reproductoras el día de la postura, incubadora, todas con una explicación biológica plausible y respaldada por la literatura.

Se evaluó también la interacción de la variable días de almacenamiento con la estirpe y la edad de las reproductoras.

La evaluación de la bondad de ajuste del modelo se realizó a través del cálculo de las medidas de resumen globales, como el Criterio de Información de Akaike (AIC), y la evaluación de los valores influyentes por medio gráfico. También se evaluó multicolinealidad y especificación del modelo.

7. RESULTADOS

Se obtuvo información de 819 grupos de huevos provenientes de 113 galpones (se reportó mínimo 1 embriodiagnóstico por galpón y máximo 23), pertenecientes a 35 lotes de reproductoras entre 24 y 64 semanas de edad, alojadas en 14 granjas distribuidas en 3 municipios del departamento de Santander. Los huevos se incubaron en tres plantas que cuentan cada una con 31, 8 y 12 máquinas, para un total de 51 incubadoras cada una con su respectiva máquina de nacimientos. Los embriodiagnósticos se realizaron entre el 6 de octubre del 2015 y el 30 de abril de 2016.

Como se puede observar en la tabla 3, la granja 11 del municipio de Piedecuesta fue la que más aportó datos de embriodiagnósticos (17,09%). Seis granjas estaban ubicadas en el municipio de Los Santos, y por esta razón cerca del 50% de los datos provino de esta zona, siendo la granja 6 la que más grupos aportó (15,63%), seguida de la granja 3, del municipio de Lebrija, con 13,31%.

En cuanto a la genética, el 97.44% proviene de la estirpe Ross 308 y el porcentaje restante a la estirpe Cobb 500, representada con un solo lote de reproductoras distribuido en 3 galpones diferentes. Cerca del 55% de las granjas presentan una temperatura promedio mayor a 28°C y la mayoría de las mismas solo cuenta con un sistema de desinfección húmeda (65,93%). Los huevos son transportados de la granja a las incubadoras principalmente en camiones sin control de ambiente (88,64%) y el 65,81% de los grupos de huevos se incuban en la incubadora 1.

Tabla 3: Características de procedencia y manejo de los grupos de huevos (observaciones en cada momento en un galón) a los que se realizó

embriodiagnóstico en las incubadoras, entre octubre de 2015 y abril de 2016 (n=819).

Variable	n	%	IC95%	
Municipio				
Los Santos	385	47,01	43,58	50,43
Lebrija	190	23,20	20,30	26,10
Piedecuesta	244	29,79	26,65	32,93
Granja				
1	29	3,54	2,27	4,81
2	59	7,2	5,43	8,98
3	109	13,31	10,98	15,64
4	71	8,67	6,74	10,60
5	38	4,64	3,20	6,08
6	128	15,63	13,14	18,12
7	51	6,23	4,57	7,89
8	27	3,3	2,07	4,52
9	42	5,13	3,61	6,64
10	22	2,69	1,58	3,80
11	140	17,09	14,51	19,68
12	23	2,81	1,67	3,94
13	79	9,65	7,62	11,67
14	1	0,12	0,00	0,36
Temperatura granja				
<=28°C	376	45,91	42,48	49,32
>28°C	443	54,09	50,67	57,51
Estirpe				
Cobb	21	2,56	1,47	3,64
Ross	798	97,44	96,35	98,52
Desinfección				
Seca y húmeda	279	34,07	30,81	37,31
Húmeda	540	65,93	62,68	69,18
Transporte				
Ambiente controlado	93	11,36	9,17	13,53
Abierto	726	88,64	86,46	90,82
Incubadora				
1	539	65,81	62,56	69,07
2	119	14,53	12,11	16,95
3	161	19,66	16,93	22,39
Mes de nacimiento				

Octubre	161	19,66	16,93	22,39
Noviembre	87	10,62	8,51	12,74
Diciembre	62	7,57	5,75	9,39
Enero	134	16,36	13,82	18,90
Febrero	202	24,66	21,71	27,62
Marzo	104	12,70	10,41	14,98
Abril	69	8,42	6,52	10,33

La mediana de la edad de las reproductoras fue de 43 semanas. La cantidad de aves de un galpón tuvo una mediana de 1179 gallinas y 133 machos, además la relación hembra: macho fue de 9,2.

Respecto al almacenamiento de los huevos, la mediana fue 5 IQR(4; 7). Se encontró una mediana de 0,16% de descarte de huevos al momento de la transferencia a la bandeja de nacimiento y la infertilidad fue 2,51% IQR(1,63; 4,11).

Con respecto a la mortalidad total, la mediana fue 9,07% IQR(7,09; 11,97), como se observa en la tabla 4. Al discriminar por etapas se encontró que la mediana de MET fue 3,87 IQR(2,70; 5,28), la de MEI fue 0,84% IQR(0,23; 1,31) y la de METa fue 4,53 IQR(3,36; 6,45). En esta última se pudo diferenciar los embriones que murieron entre los días 12 y 18 con una mediana de 0,99 IQR(0,44; 1,61). Además se calculó la mediana de embriones que alcanzaron a picar la cáscara pero no lograron eclosionar y de los pollos que estaban vivos pero no pudieron picotear la cáscara siendo 1,03% IQR(0,44; 1,61) y 0,22 IQR(0,00; 0,51) respectivamente.

En cuanto a otras anomalías se encontraron huevos con diferentes malposiciones (1,51% IQR(1,04; 2,30)) y malformaciones (0,21% IQR(0,00; 0,46)). La contaminación con hongos fue muy baja, mientras que la contaminación con bacterias tuvo una mediana de 0,4% IQR(0,00; 0,61). Además, se encontraron algunos huevos con la cáscara fisurada (0,6% IQR(0,20; 1,01)).

Tabla 4: Descripción de las características productivas de las reproductoras de cada galpón (para el día de postura de cada grupo de huevos evaluados) y hallazgos más relevantes de los embriodiagnósticos realizados en las incubadoras, entre octubre de 2015 y abril de 2016 (n=819).

Variable	Mediana	IQR	
Edad (semanas)	43	34	53
Cantidad de reproductoras	1179	834	4745
Cantidad de reproductores	133	92	573
Relación Hembra: Macho	9,2	9,04	9,5
% Mortalidad reproductoras	0	0	0,03
% Mortalidad reproductores*	0,06	0,04	0,08
% Producción	70,76	60,06	81,9
% Huevo incubable	94,31	92,16	96,06
Almacenamiento (días)	5	4	7
Huevo cargado	3225	1760	4860
% Descarte a la transferencia	0,16	0	0,33
% Infertilidad	2,51	1,63	4,11
% Mortalidad total	9,07	7,09	11,97
% Mortalidad embrionaria temprana (1-4 días)	3,87	2,7	5,28
% Mortalidad embrionaria intermedia (5-11 días)	0,84	0,23	1,31
% Mortalidad embrionaria tardía (12-21 días)	4,53	3,36	6,45
% Mortalidad embrionaria tardía (12-18 días)	0,99	0,44	1,61
% Picados no nacidos	1,03	0,44	1,75
% Pollos vivos sin picar cáscara	0,22	0	0,51
% Embriones mal posicionados	1,51	1,04	2,3
% Embriones con malformaciones	0,21	0	0,46
% Huevos contaminados con hongos*	0,02	0,01	0,02
% Huevos contaminados con bacterias	0,4	0	0,61
% Huevos con cáscara fisurada	0,6	0,2	1,01
% Nacimiento	87,67	83,12	90,12
% Pollos de baja calidad	0,68	0,44	0,85
% Hembras nacidas	50,65	50	52,08
% Machos nacidos	49,35	47,92	50

*Media +/- DE porque la mediana y el IQR fueron cero

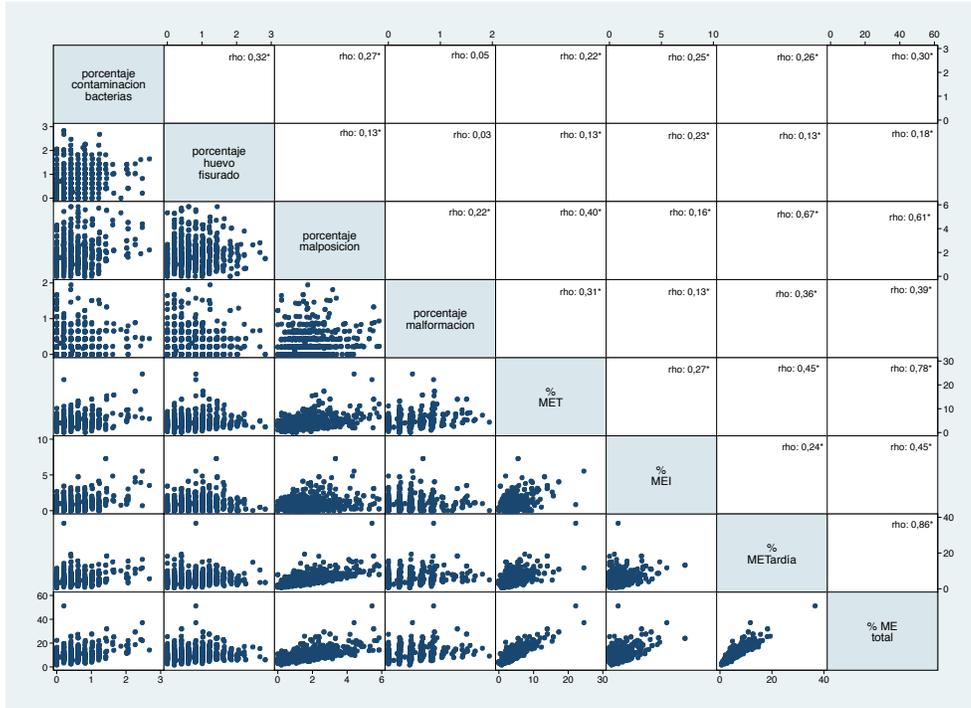
El porcentaje total de nacimiento fue de 87,67 IQR(83,12; 90,12). Se encontró una mediana de 0,68% IQR(0,44; 0,85) de pollos de baja calidad y un total de 50,65% IQR(50,00; 2,08) del total de aves nacidas fueron hembras.

Al realizar el análisis de correlación (gráfica 1), se encontró que todos los tipos de mortalidad tuvieron relación moderada y positiva con el porcentaje de infertilidad y los demás tipos de mortalidad y además con algunos hallazgos a la embriodiagnósis como malformación, malposición, contaminación bacteriana y fisuras en la cáscara. La correlación con la edad fue baja y solo significativa para la MEI y la METa, mientras que el porcentaje de producción de huevos mostró relación negativa en todas las categorías de mortalidad (gráfica 2).

La cantidad de machos y hembras del galpón, al igual que la mortalidad de los mismos el día de la postura del huevo no mostraron correlación con ninguno de los tipos de mortalidad. El almacenamiento de los huevos en el cuarto frío de la incubadora se relacionó levemente con el incremento de mortalidad, excepto en la METa. El descarte de huevos al momento de la transferencia, el día 18, solo se relacionó positivamente con la MET.

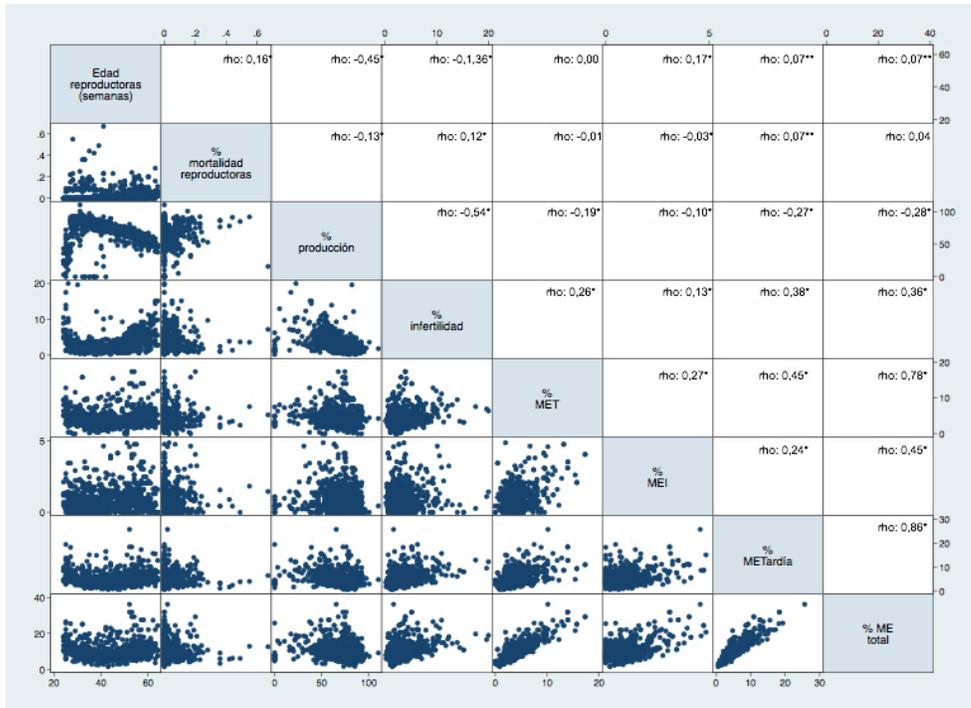
Como era de esperarse, se observó una fuerte correlación positiva entre la mortalidad embrionaria total y la mortalidad en cada una de las semanas de incubación. Igualmente, el porcentaje de nacimientos mostró una fuerte correlación negativa con cada una de las etapas de la mortalidad, pero sobre todo con la mortalidad total. Por último, no se encontró relación entre la mortalidad y el nacimiento de pollos de baja calidad ni tampoco entre esta y el sexo de los pollos nacidos.

Gráfica 1: Matriz de dispersión de algunos hallazgos relevantes para cada grupo de huevos respecto al porcentaje de mortalidad de cada etapa, observados en el embriodiagnóstico



rho de prueba de Spearman. Se eliminaron 6 observaciones con % de fisura > 3,6 y 4 con % de bacterias > 3. * p < 0,001

Gráfica 2: Matriz de dispersión de algunas características productivas de las reproductoras (para el día de postura) respecto al porcentaje de mortalidad de cada etapa encontrado en el embriodiagnóstico.

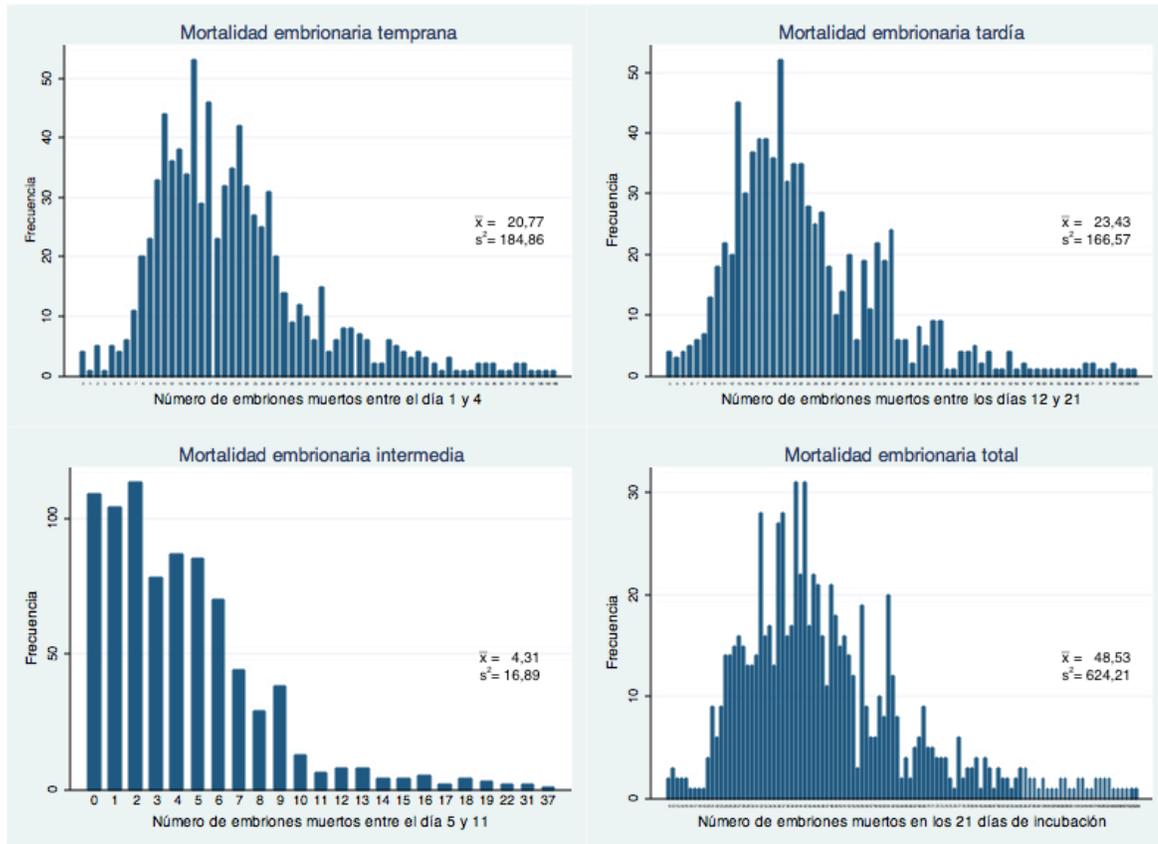


rho de prueba de Spearman. Se eliminaron 4 observaciones con % MET > 20 y 4 con % mortalidad reproductoras > 0,8. $^{**}p < 0,05$

* $p < 0,001$

En cuanto al análisis de la mortalidad como datos de conteo, en la gráfica 3 se muestra la distribución de los embriones muertos en cada grupo de huevos, en cada etapa de la mortalidad. Además, se presenta la media y la varianza de las observaciones en cada etapa de la mortalidad. Bajo el modelo de Poisson se espera que la media y la varianza sean iguales, por lo tanto es posible que exista sobredispersión y que sea necesario utilizar un modelo alternativo que permita controlar este problema.

Gráfica 3: Distribución del conteo de embriones muertos en cada etapa para cada grupo de huevos a los que se realizó embriodiagnóstico en las incubadoras, entre octubre de 2015 y abril de 2016 (n=819).



x: media; s^2 : varianza

Teniendo en cuenta esto, se realizaron a priori las pruebas para verificar si la información cumple con el supuesto de distribución de Poisson. Bajo la hipótesis nula de que los datos se comportan tienen esta distribución, la prueba de bondad de ajuste, la prueba de la varianza y la prueba asintótica permiten con unanimidad rechazar la hipótesis nula y concluir que los datos no se comportan como una distribución de Poisson, por lo cual se decide utilizar el modelo binomial negativo para el análisis (anexo B).

Los modelos binomiales negativos nulos de efectos aleatorios a nivel galpón y granja para cada etapa de la mortalidad se compararon con los modelos binomiales estándar y todos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,001$), lo cual significa que una parte de la varianza de la tasa de mortalidad está relacionada con los dos niveles evaluados, por lo tanto varía entre galpones y entre lotes. Por esta razón, se definió el modelo binomial negativo multinivel como la aproximación más adecuada para modelar los datos (anexo C).

El anexo D muestra el análisis bivariado en el modelo binomial negativo de las variables de galpón y lote con la ME en cada etapa. La estirpe solo estuvo asociada con la METa, mientras que la temperatura de la granja lo fue para la MET y METa. La edad categorizada de acuerdo a la guía de la estirpe fue significativa para todas las etapas, al igual que el porcentaje de infertilidad, de embriones con malposiciones y malformaciones, de huevos contaminados y de huevos con fisuras en la cáscara.

Se encontraron diferencias significativas para todas las categorías de mortalidad de acuerdo al método usado en la granja para desinfectar la superficie de los huevos. También, se observaron diferencias de acuerdo a la temperatura promedio de las granjas y por planta incubadora a la que fueron enviados los huevos. Igualmente, hubo diferencias por mes y por granja y municipio de procedencia de los huevos. En cuanto a la estirpe, se observaron diferencias para todos los tipos de mortalidad excepto para la MET, mientras que para el tipo de camión utilizado para transportar los huevos de la granja a las incubadoras solo se observaron diferencias en MEI.

En los modelos finales para cada etapa de la ME, presentados en la tabla 5, se encontró que el tipo de planta incubadora y el porcentaje de contaminación de los huevos fueron factores comunes asociados a todos los tipos de mortalidad. Mientras tanto, la edad fue determinante para la mortalidad en cada etapa de

incubación, pero no para la mortalidad total; igualmente el transporte y los días de almacenamientos influenciaron todos los tipos de mortalidad excepto la METa. El porcentaje de embriones con malposición afectó la METa y la ME total; así mismo, el porcentaje de malformación resultó asociado a estas dos mortalidades pero además a la MET. El porcentaje de infertilidad influenció todas los tipos de mortalidad excepto la MEI, y el porcentaje de huevos fisurados fue determinante en la MET y MEI. El método de desinfección del huevo solo tuvo efecto sobre la MEI, y la estirpe influyó sobre la METa y ME total. Finalmente se encontró una interacción entre la edad y el tiempo de almacenamiento de los huevos, asociada a la MET.

Tabla 5: Modelo multinivel binomial negativo para evaluar la asociación entre mortalidad embrionaria temprana, intermedia, tardía y total y características productivas de las reproductoras, de manejo de los huevos y de hallazgos al embriodiagnóstico; con efectos aleatorios a nivel galpón y fijos en granja y lote (n=819).

Variable	MET			MEI			METa			ME Total		
	IRR	IC 95%	Valor p									
Incubadora			<0,001			<0,001			0,004			0,001
1	Referencia			Referencia			Referencia			Referencia		
2	0,68	0,62 0,74		1,85	1,57 2,17		0,89	0,83 0,96		0,90	0,85 0,96	
3	0,74	0,68 0,80		1,43	1,24 1,66		0,83	0,78 0,89		0,87	0,83 0,92	
Edad (huevos almacenados 7 días o menos)*												
25-30 semanas	Referencia											
31-45 semanas	1,05	0,94 1,18	0,381	-	- -		-	- -		-	- -	
46-50 semanas	1,19	1,01 1,39	0,036	-	- -		-	- -		-	- -	
51-64 semanas	1,21	1,03 1,42	0,024	-	- -		-	- -		-	- -	
Edad (huevos almacenados más de 7 días)*												
25-30 semanas	Referencia											
31-45 semanas	1,26	0,88 1,80	0,132	-	- -		-	- -		-	- -	
46-50 semanas	1,59	0,97 2,61	0,079	-	- -		-	- -		-	- -	
51-64 semanas	1,59	1,04 2,43	0,033	-	- -		-	- -		-	- -	
Edad						<0,001			0,034			
25-45 semanas				Referencia			Referencia					
46-64 semanas	-	- -		1,46	1,22 1,75		0,92	0,85 0,99		-	- -	
Almacenamiento												
<= 7 días										Referencia		
> 7 días	-	- -		-	- -		-	- -		1,07	1,01 1,13	0,023
Almacenamiento	-	- -		1,03	1,00 1,05	0,018	-	- -		-	- -	
% Infertilidad	1,05	1,03 1,06	<0,001	-	- -		1,04	1,03 1,05	<0,001	1,04	1,03 1,05	<0,001

% Contaminación	1,29	1,22	1,37	<0,001	1,27	1,14	1,42	<0,001	1,11	1,06	1,17	<0,001	1,25	1,20	1,30	<0,001
Huevo fisurado (según guía)								0,002								
Normal					Referencia											
Exceso					1,19	1,07	1,33									
% Huevo fisurado	1,10	1,05	1,15	<0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% Malformación	1,45	1,33	1,58	<0,001	-	-	-	-	1,33	1,24	1,42	<0,001	1,33	1,26	1,40	<0,001
% Malposición	-	-	-	-	-	-	-	-	1,20	1,18	1,23	<0,001	1,17	1,15	1,19	<0,001
Transporte				0,007				<0,001								<0,001
Controlado	Referencia				Referencia								Referencia			
Abierto	0,82	0,71	0,95		0,58	0,46	0,72	-	-	-	-	-	0,83	0,77	0,89	
Desinfección								0,017								
Seca y húmeda					Referencia											
Húmeda	-	-	-	-	2,96	1,21	7,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MET	-	-	-	-	1,08	1,06	1,10	-	1,02	1,01	1,03	0,001	-	-	-	-
MEI	-	-	-	-	-	-	-	-	1,06	1,03	1,10	<0,001	-	-	-	-
Estirpe																0,005
Cobb 500									Referencia				Referencia			
Ross 308	-	-	-	-	-	-	-	-	1,67	1,28	2,19	<0,001	1,36	1,10	1,68	

*Se encontró una interacción estadísticamente significativa entre la edad (categorizada según la guía) y el almacenamiento de los huevos. Se presenta el IRR, IC y valor p para la edad según las dos categorías de almacenamiento.

8. DISCUSIÓN

Es frecuente encontrar en la literatura múltiples estudios experimentales que demuestran la influencia sobre la ME de diversos factores de manejo de huevos tanto en granja como en incubación. Sin embargo, son pocos los que buscan determinar cuáles de estos factores son críticos en la aplicación de la avicultura de campo. Aunque es claro que los experimentos han permitido establecer prácticas eficientes en producción e incubación de huevos, el impacto real de estos factores en campo no necesariamente es el mismo que se observa bajo condiciones ideales de laboratorio, ya que en el ambiente práctico confluyen muchos aspectos que interactúan y afectan la ME y contribuyen a su incremento o reducción en magnitud diferente a cuando se evalúan solo dos o tres factores con todos los demás confusores controlados.

En el presente estudio, se presentó un incremento 3% en la MEI por cada día adicional de almacenamiento de los huevos. Igualmente, cuando se observó su impacto en la ME total, se encontró un incremento del 7% en su frecuencia cuando los huevos se almacenaron por más de 7 días, comparados con aquellos que se almacenaron 7 días o menos.

Este hallazgo es compatible con el de otros autores que determinaron que almacenar los huevos por más de 7 días^{172,173} influye negativamente en la capacidad de eclosión del embrión por daños irreversibles que causan mortalidad^{174,175}, prolongación del tiempo de incubación¹⁷⁶ y disminución en la

¹⁷² FASENKO GM. Op. Cit.

¹⁷³ REIJRINK IA, MEIJERHOF R, KEMP B, VAN DEN BRAND H. Op. Cit

¹⁷⁴ FASENKO GM. Op. Cit.

¹⁷⁵ REIJRINK IAM, MEIJERHOF R, KEMP B, GRAAT EAM, VAN DEN BRAND H, Op. Cit.

¹⁷⁶ MATHER CM, LAUGHLIN KF. Storage of hatching eggs: The effect on total incubation period. Br Poult Sci. 2007;17(5):471–9.

calidad de los pollos¹⁷⁷. En embriones de pollos de engorde, el almacenamiento de huevos durante 14 días comparado con el almacenamiento durante 4 días, aumentó la mortalidad embrionaria en la etapa temprana y tardía de incubación y la mortalidad global del embrión pasó de 10,7% en los embriones con 4 días de almacenamiento a 27,7% en los embriones de huevos con 14 días de almacenamiento¹⁷⁸. Aunque en este estudio la METa no se vio impactada por el almacenamiento, si lo fue durante los primeros 14 días de incubación y además en la mortalidad total.

Se sugirió que el tiempo prolongado de almacenamiento induce estrés al embrión, manifestado por el incremento de muerte celular a través de necrosis y apoptosis^{179,180,181}; el resultado es una mayor mortalidad embrionaria. Además, el almacenamiento prolongado podría influir sobre el desarrollo y el metabolismo embrionario. Se ha establecido que embriones almacenados durante 15 días tienen menor capacidad para expulsar el CO₂ que embriones almacenados 4 días y además, que los primeros dependen más de la gluconeogénesis durante el picoteo de la cáscara y la eclosión. En un estudio se compararon dos estirpes, una de las cuales es sensible a la mortalidad inducida por el almacenamiento, y se observó que la estirpe resistente fue capaz de mantener grandes reservas de glucógeno en el músculo y en el corazón, comparada con la estirpe sensible¹⁸². Además, los embriones de huevos almacenados durante largo tiempo pueden estar afectados de tal manera que no inician el crecimiento después que se

¹⁷⁷ TONA K, BAMELIS F, DE KETELAERE B, BRUGGEMAN V, MORAES V, BUYSE J, et al. Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. *Poult Sci.* 2003;82(5):736–41.

¹⁷⁸ FASENKO GM, ROBINSON FE, WHELAN AI, KREMENIUK KM, WALKER JA. Op. Cit.

¹⁷⁹ DYMOND J, VINYARD B, NICHOLSON AD, FRENCH NA, BAKST MR. Op. Cit.

¹⁸⁰ BAKST MR, AKUFFO V. Impact of egg storage on embryo development. *Avian and Poultry Biology Reviews.* 2002; 13(3), 125-131.

¹⁸¹ BLOOM SE, MUSCARELLA DE, LEE MY, RACHLINSKI M. Cell death in the avian blastoderm: resistance to stress-induced apoptosis and expression of anti-apoptotic genes. *Cell Death and Differ.* 1998;5(6):529–38.

¹⁸² CHRISTENSEN VL, WINELAND MJ, FASENKO GM, DONALDSON WE. Egg Storage Effects on Plasma Glucose and Supply and Demand Tissue Glycogen Concentrations of Broiler Embryos. *Poult Sci.* 2001;80(12):1729–35.

proporcionan las temperaturas adecuadas de incubación o inician el crecimiento, pero crecen a un ritmo más lento que los huevos almacenados pocos días¹⁸³.

Específicamente, para la MET fue evidente una interacción entre los días de almacenamiento y la edad del lote según la cual, cuando los huevos son almacenados máximo 7 días, la MET incrementa entre 19 y 21% para los huevos de reproductoras con más de 46 semanas de edad, mientras que este incremento es de 59% cuando se almacenan huevos de reproductoras de más de 50 semanas por más de 7 días. Si bien, la magnitud de los efectos no se pudieron comparar con otros estudios, sí fue evidente esta misma tendencia en otra investigación en la que la disminución de la viabilidad del embrión por cada día adicional de almacenamiento del huevo fue de 0,82% para las reproductoras de 32 semanas y 1,92% para las de 59 semanas de edad.

Respecto a lo anterior, aunque no se pudo establecer una relación clara entre el pH del albumen y la incubabilidad, sí se observó que la calidad del albumen se deterioró significativamente con la edad del lote, posiblemente influenciado por el cambio del pH del albumen durante el almacenamiento¹⁸⁴, lo que puede llegar a afectar la supervivencia del embrión¹⁸⁵, como lo observó Hurnik et al. en 1978 en un estudio en el cual los huevos con mejor calidad de albúmina después de un almacenamiento de 3 a 4 semanas, tuvieron mejor incubabilidad, ya que probablemente tuvieron una mayor disponibilidad de mucoproteínas esenciales para el desarrollo del embrión durante la incubación¹⁸⁶, lo cual es posible a pH entre 8,3 y 8,5¹⁸⁷.

¹⁸³ FASENKO GM. Op. Cit.

¹⁸⁴ SCOTT TA, SILVERSIDES FG. The effect of storage and strain of hen on egg quality. *Poult Sci.* 2000;79(12):1725–9.

¹⁸⁵ LAPÃO C, GAMA LT, SOARES MC. Effects of broiler breeder age and length of egg storage on albumen characteristics and hatchability. *Poult Sci.* 1999;78(5):640–5.

¹⁸⁶ HURNIK GI, REINHART BS, HURNIK JF. Relationship between albumen quality and hatchability in fresh and stored hatching eggs. *Poult Sci.* 1978;57(4):854–7.

¹⁸⁷ MCKERLEY RG, NEWELL GW, BERRY JG, ODELL G V, MORRISON RD. The effects of some acidic and alkaline atmospheres on the changes in pH and Haugh units in chicken eggs. *Poult Sci.* 1967;46(1):118–32.

Por otra parte, después de la ovoposición, se libera CO₂ del huevo, lo que resulta en un incremento del pH del albumen de 7,6 a 9,5 en un corto periodo de tiempo, mientras que la yema permanece levemente ácida, con un pH de 6,5, lo que expone al blastodermo a un ambiente muy alcalino hacia el dorso del epiblasto, mientras que la superficie ventral está sometida a un ambiente ácido¹⁸⁸. Se realizó un experimento con el fin de determinar la influencia del almacenamiento y la edad de las reproductoras sobre el pH del albumen y la relación de este con la mortalidad embrionaria. Se encontró que el pH aumentó con el tiempo de almacenamiento, especialmente en lotes de reproductoras jóvenes, pasando de 8,2 a 9,15 en 8 días de almacenamiento. Esta diferencia en las edades podría estar explicada de dos maneras: la primera es que la incidencia de huevos al comienzo y al final de la secuencia de postura es mayor en gallinas viejas, y estos huevos tienden a contener embriones en estado de desarrollo más avanzado¹⁸⁹ en los cuales la actividad metabólica y la difusión de CO₂ hacia el exterior del huevo es mayor¹⁹⁰; la segunda explicación posible es que la conductancia de la cáscara de huevos de gallinas viejas permite una liberación más rápida de CO₂ de los huevos¹⁹¹.

El tipo de planta incubadora fue determinante para todas las etapas de incubación y para la ME total y para poder analizar este resultado es importante caracterizar cada una de las construcciones. La incubadora 1 es la de mayor capacidad y la más antigua de las 3 plantas. Consta de 31 maquinas incubadoras y sus respectivas bandejas de nacimiento, además cuenta con un amplio cuarto fría para el almacenamiento de huevos pero la estructura de la construcción es abierta y antes de ingresar los huevos a la incubadora, son atemperados a temperatura

¹⁸⁸ STERN CD, TULLETT SG. The sub-embryonic fluid of the egg of the domestic fowl and its relationship to the early development of the embryo. Avian incubation. 1990. pág. 81–90.

¹⁸⁹ FASENKO GM, HARDIN RT, ROBINSON FE, WILSON JL. Relationship of Hen Age and Egg Sequence Position with Fertility, Hatchability, Viability, and Preincubation Embryonic Development in Broiler Breeders. Poult Sci. 1992;71(8):1374–83.

¹⁹⁰ KUČERA P, RADDATZ E. Spatio-temporal micromeasurements of the oxygen uptake in the developing chick embryo. Respir Physiol. 1980;39(2):199–215.

¹⁹¹ MEIJERHOF R. Op. Cit.

ambiente. Por su lado, la incubadora 2 cuenta con máquinas incubadoras nuevas pero su particularidad es que no cuenta con cuarto frío, por lo cual los huevos que llegan son ingresados directamente a la incubadora. Finalmente la incubadora 3 es la más nueva y pequeña pero cuenta con una amplia ventaja en cuanto a que es la única con ambiente completamente controlado, cuenta con cuarto frío y los huevos después del almacenamiento son atemperados a temperatura controlada, es decir, son preincubados antes de ingresar a la incubadora. Estas particularidades pueden explicar por qué la tendencia general es que la incubadora 2 puede reducir entre 10 y 30% la ME y la incubadora 3 siga el mismo comportamiento, con una reducción entre 13 y 26%, cuando se comparan con la incubadora 1.

Por una parte, todas las incubadoras son de la misma marca y de tipo etapa múltiple, aunque las más nuevas poseen sistemas operativos más actualizados que permiten un mejor control de ambiente gracias sus avances tecnológicos. Esto siempre representará ventajas si se tiene en cuenta que uno de los puntos más importantes de la incubación es el control de los factores medioambientales que impactan al embrión e incluyen la temperatura, humedad relativa, ventilación, entre otros.

Respecto las tecnologías de incubación, un estudio comparó los dos tipos de incubadoras, de carga múltiple en la que hay embriones de diferentes edades y las de carga única en las cuales se manejan embriones en la misma fase embrionaria, y encontró que en la etapa múltiple se presentó la mayor MEI y METa en el lote de gallinas viejas, ya que en este sistema es imposible ajustar la temperatura para cada etapa embrionaria, por lo cual se produce sobrecalentamiento del embrión a partir de los 9 días de incubación¹⁹². Esta desventaja siempre impactará la ME de la empresa, aunque no sea posible evaluar la magnitud en que lo hace ya que no hay como efectuar la comparación de los sistemas. Sin embargo, también se manejan estrategias en la práctica, como lo es incubar huevos de reproductoras

¹⁹² LOURENS A, VAN DEN BRAND H, HEETKAMP MJW, MEIJERHOF R, KEMP B. Op. Cit.

de diferentes edades para que la diferencia de tamaños permita mantener un equilibrio en la distribución del calor producido por huevos grandes y pequeños.

La existencia de cuarto frío podría explicar en parte las diferencias entre la incubadora 2 y 3 en cuanto al mejor desempeño de la 3 en la reducción de METa y ME total. En la incubadora 2 los huevos son incubados sin previo almacenamiento y frente a esto se ha establecido que cuando se incuban huevos inmediatamente después de la ovoposición, se obtiene menor cantidad de pollos que los obtenidos de huevos almacenados durante por lo menos 4 días. Esto revela que almacenar los huevos incubables tiene algunas ventajas, y aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual esto ocurre, se ha planteado la hipótesis de que la alta viscosidad del albumen de los huevos frescos, impide el transporte adecuado de O₂ al embrión. Adicionalmente, es posible que el embrión se enfrente a un inapropiado gradiente de pH trans-membrana vitelina, que limita la difusión de gases y la disponibilidad de nutrientes¹⁹³.

Adicionalmente, si además de contar con máquinas con tecnología de punta e instalaciones adecuadas, estas se encuentran en un ambiente controlado completamente, en el que los cambios de temperatura del huevo y las condiciones ambientales están controladas en cada fase del proceso (almacenamiento, atemperado e incubación), es fácil entender por qué los resultados de la incubadora 2 y 3 son mucho mejores que los de la incubadora 1, en la que no solo el desgaste de las instalaciones sino también el impacto generado por cualquier evento ambiental adverso que no puede ser controlado, repercuten en una ME más alta.

Hay que mencionar, además otro aspecto que impactó la ME y que está íntimamente ligado a condiciones ambientales previas al almacenamiento fue el tipo de camión utilizado para el transporte de huevos desde la granja a la

¹⁹³ BENTON CE, BRAKE J. The effect of broiler breeder flock age and length of egg storage on egg albumen during early incubation. *Poult Sci.* 1996;75(9):1069–75.

incubadora. Al respecto, se encontró que los camiones sin control de ambiente resultaron disminuir la frecuencia de ME entre 17 y 42%, excepto en la etapa tardía, cuando se compararon con los grupos de huevos transportados en camiones de ambiente controlado. Lo anterior está en contra de lo que se esperaría en la práctica, ya que al contar con camiones controlados se espera que los embriones no sufran cambios bruscos de temperatura, teniendo en cuenta que las zonas donde están ubicadas las granjas pueden superar los 35°C en días de extremo calor.

Por otro lado, los camiones de ambiente controlado permiten que los huevos sean transportados en unas condiciones de aislamiento del medio externo. La mayoría de las granjas están ubicadas en veredas lejanas (hasta 3 horas de trayecto) que carecen de vías pavimentadas, por lo tanto los huevos transportados en camiones abiertos quedan expuestos al polvo y a condiciones que favorecen el contacto con diversos tipos de microorganismos que pueden contaminar los huevos susceptibles.

La razón por la cual se encontró este resultado contradictorio podría relacionarse con el hecho de que los datos se recogieron en un momento en el que apenas se estaba implementando el ambiente controlado en los camiones, y podría deberse a un manejo inadecuado del sistema, ya que como pudo comprobarse, el personal ponía en funcionamiento el control de temperatura antes de ingresar los huevos al camión y a medida que se cargaban, se sometían a un inesperado aumento y posterior disminución de la misma, cada vez que el camión se estacionaba en una bodega de huevo. Esta oscilación de la temperatura podría impactar negativamente el desarrollo del embrión.

Adicionalmente, ante las desventajas conocidas de los camiones abiertos se tomaban algunas medidas como transportar los huevos en las horas de menor intensidad del calor o destinar los camiones de ambiente controlado para las zonas mas lejanas, lo que podría permitir pensar que se obtuvo peor resultado en

ME con el transporte de ambiente controlado más por manejo inadecuado del sistema, que por beneficios atribuidos a los camiones abiertos.

Un factor muy importante en este análisis es el porcentaje de contaminación. Es evidente que su efecto es directamente proporcional a la ME en todas sus categorías, teniendo mayor impacto en la MET con un incremento de 29% por cada unidad porcentual de contaminación que se incremente, seguida de la MEI y la ME total con 27 y 20% respectivamente y finalmente un menor impacto en la MET con un 6%.

El huevo está protegido físicamente por la cáscara y químicamente por anticuerpos, conocidos como IgYs, principalmente contenidos en la yema¹⁹⁴ y en todo el huevo por numerosos péptidos y proteínas que poseen propiedades antimicrobianas. Estas moléculas constituyen una inmunidad innata y son secretadas preventivamente por el ovario de la gallina hacia la yema para proteger el embrión, y por otros segmentos del oviducto en otros compartimientos del huevo (albumen, membranas de la cáscara y cáscara)¹⁹⁵.

Las proteínas y péptidos operarán a través de tres mecanismos: el primero es por secuestro de nutrientes esenciales de las bacterias a través de la quelación de minerales (hierro) o de vitaminas (biotina) por proteínas como la ovotransferrina y la avidina, respectivamente¹⁹⁶; en segundo lugar, se inhiben las proteasas exógenas necesarias para el metabolismo microbiano y la invasión de los tejidos del hospedero (antiproteasas del huevo que incluyen cistatina, ovomucoide y

¹⁹⁴ ROSE ME, ORLANS E, BUTTRESS N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur J Immunol.* 1974;4(7):521–3.

¹⁹⁵ BEDRANI L, HELLOIN E, GUYOT N, RÉHAULT-GODBERT S, NYS Y. Passive maternal exposure to environmental microbes selectively modulates the innate defences of chicken egg white by increasing some of its antibacterial activities. *BMC Microbiol.* 2013;13:128.

¹⁹⁶ SHAWKEY MD, KOSCIUCH KL, LIU M, ROHWER FC, LOOS ER, WANG JM, et al. Do birds differentially distribute antimicrobial proteins within clutches of eggs? *Behav Ecol.* 2008;19(4):920–7.

ovoinhibidor)¹⁹⁷; y por último, acción directa de lisis de microorganismos por la lisozima o péptidos de la familia de las defensinas que actúan en la disrupción de la pared de la célula bacteriana¹⁹⁸. También se ha relacionado el aumento del pH de la albúmina a 9 con la protección del embrión contra las bacterias¹⁹⁹.

La principal fuente de contaminación es el contacto de la cáscara con superficies sucias. Tiende a ocurrir inmediatamente después que el huevo es puesto (contaminación horizontal) a pesar de sus eficientes barreras protectoras²⁰⁰, por lo cual la desinfección del lugar de ovoposición es crítica para la limpieza de la cáscara²⁰¹. Igualmente los sistemas de cría de las reproductoras y las condiciones de su microambiente podrían impactar tanto en la modulación de la inmunidad²⁰² como en la calidad del huevo y la incidencia de contaminación. De Reu et al. en 2009 compararon sistemas de jaulas equipadas y sistemas de cría en piso en cuanto a contaminación de la cáscara, y huevos sucios y rotos, y encontraron diferencias microbiológicas de limitada relevancia entre los dos sistemas, aunque sí encontraron diferencias entre granjas con el mismo tipo de sistema, lo que indicaría que las variaciones en la construcción y manejo de las granjas juegan un papel importante en la contaminación de la cáscara²⁰³. Es importante tener en cuenta esto, ya que aunque el sistema de producción de huevos de toda la empresa es en piso, tiene implementado un programa de bioseguridad que incluye manejo permanente de desinfectantes tanto para el personal que maneja los lotes,

¹⁹⁷ SCHÄFER A, DREWES W, SCHWÄGELE F. Effect of storage temperature and time on egg white protein. *Food/Nahrung*. 1999;43(2):86–9.

¹⁹⁸ VAN DIJK A, VELDHUIZEN EJA, HAAGSMAN HP. Avian defensins. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;124(1):1–18.

¹⁹⁹ REIJRINK IA, MEIJERHOF R, KEMP B, VAN DEN BRAND H. Op. Cit.

²⁰⁰ DE REU K, GRIJSPEERDT K, MESSENS W, HEYNDRICKX M, UYTTENDAELE M, DEBEVERE J. Op. Cit.

²⁰¹ HRNČÁR C, PRACHÁROVÁ S, BUJKO J. The Effect of Disinfection of Hatching Eggs on Hatchability of Oravka Chickens. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*. 2012;45(2):411–4.

²⁰² BEDRANI L, HELLOIN E, GUYOT N, RÉHAULT-GODBERT S, NYS Y. Op. Cit.

²⁰³ DE REU K, RODENBURG TB, GRIJSPEERDT K, MESSENS W, HEYNDRICKX M, TUYTTENS FAM, et al. Bacteriological contamination, dirt, and cracks of eggshells in furnished cages and noncage systems for laying hens: an international on-farm comparison. *Poult Sci*. 2009;88(11):2442–8.

como para el ambiente en el que permanecen las gallinas, como lo es el cambio y desinfección periódica del tamo que cubre los nidos y que está en contacto directo con el huevo.

Bruce y Johnson en 2007 encontraron un nivel de contaminación promedio de 12,7% en huevos que no lograron eclosionar en incubadoras comerciales, y reportaron que la flora contaminante estuvo compuesta principalmente de *Micrococcus sp.* y *Enterobacteriaceae*, con *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.* presentes en bajos niveles²⁰⁴. En otro estudio en huevos de codornices que no eclosionaron, encontraron al menos 15,8% de contaminación con *Enterobacteriaceae*. Las bacterias observadas fueron: *E. coli* (6.57%), *Klebsiella spp.* (0.89%), *Proteus spp.* (2.98%), *Citrobacter spp.* (1.49%), *Salmonella spp.* (2.98%) y otras *Enterobacteriaceae* (0.89%)²⁰⁵ (136). En huevos de paloma, se clasificaron las especies de hongos que había en la cáscara, y reportaron especies de los filos *Ascomycetos* y *Basidiomicetos*. En la incubación temprana predominaron los *Ascomycetos* (64,6%), que aumentaron su población hacia el final de la incubación (89,4%)²⁰⁶.

Por otro lado, se han desarrollado técnicas de desinfección del huevo como la frotación, aspersion o inmersión para controlar la amplia gama de microorganismos mencionados anteriormente. Los huevos pueden ser desinfectados durante la incubación o antes de la transferencia a la bandeja de nacimiento, pero lo más común es que se haga previo a la incubación. Sin embargo, los productos químicos con que se hace el proceso pueden ser sustancias toxicas que dañan el embrión si no se hace de manera correcta, lo que

²⁰⁴ BRUCE J, JOHNSON AL. The bacterial flora of unhatched eggs. Br Poult Sci. 2007;19(5):681–9.

²⁰⁵ JAHANTIGH M, RASHKI A, NAJIMI M. A study on bacterial flora and antibacterial resistance of yolk sac infection in Japanese quail (*Coturnix japonica*). Comp Clin Path. 2013;22(4):645–8.

²⁰⁶ GRIZARD S, DINI-ANDREOTE F, TIELEMAN BI, SALLES JF. Dynamics of bacterial and fungal communities associated with eggshells during incubation. Ecol Evol. 2014;4(7):1140–57.

también podría contribuir al aumento de la incidencia de mortalidad embrionaria²⁰⁷; aunque, en general, con buenas técnicas de desinfección se reporta éxito en los tratamientos, a través del incremento de la incubabilidad.

Brake y Sheldon en 1990, reportan un incremento de la incubabilidad sobre fértiles de alrededor del 6% de huevos de gallinas de 32 semanas desinfectados con amonio cuaternario comparado con huevos no desinfectados. Esto, relacionado con la disminución de la MET y la reducción del recuento de microorganismos aerobios en la superficie del huevo. Sin embargo, también observaron que las propiedades de la cáscara respecto a pérdida de agua e intercambio gaseoso se alteraron, lo cual bajo ciertas circunstancias como huevos de gallinas viejas o baja humedad relativa, podría afectar la ME²⁰⁸. Para contrarrestar este inconveniente se han implementado métodos de desinfección con productos como formol, que implican que la cáscara no se moja, por lo tanto la alteración de la cutícula es menor.

De acuerdo con esto, cabe mencionar que el método de desinfección utilizado en las granjas tuvo impacto en la ME, aunque solo en la segunda semana. Se encontró que la frecuencia de ME fue 2,96 veces mayor en grupos de huevos desinfectados con amonio cuaternario, comparado con grupos de huevos provenientes de granjas en las que además de este sistema (que es usado en huevos que presentan algún residuo en la cáscara), cuentan con sistema de desinfección seca con gas de formol (usados en huevos con la cáscara completamente limpia). Esto podría estar relacionado con las alteraciones de la cáscara mencionadas anteriormente, aunque dada la reducida MEI podría pensarse que el impacto de este factor no es crucial para el problema de ME; por

²⁰⁷ CADIRCI S. Desinfection of hatching eggs by formaldehyde fumigation - A review. Arch fur Geflugelkd. 2009;73(2):116–23.

²⁰⁸ BRAKE J, SHELDON BW. Effect of a Quaternary Ammonium Sanitizer for Hatching Eggs on Their Contamination, Permeability, Water Loss, and Hatchability. Poult Sci. 1990;69(4):517–25.

el contrario, de existir problemas con el método de desinfección, se esperaría que la mayor repercusión estuviera en el incremento de MET²⁰⁹.

En cuanto al porcentaje de huevos fisurados, el cual resultó incrementar la MET y MEI cabe mencionar que hace referencia a la proporción de huevos que tienen la cáscara rota pero sus membranas permanecen intactas. Debido a la función dual de la cáscara de proteger el embrión de injurias externas y facilitar el movimiento de gases para la respiración, su ruptura impacta la viabilidad del embrión al exponerlo a contaminación microbiana, concentraciones de gases anormales y deshidratación²¹⁰.

La infertilidad resultó estar relacionada con todos los tipos de mortalidad, excepto con la MEI. Con respecto a MET, se ha establecido que existe asociación entre el promedio de penetración espermática y el aumento de su incidencia. Aunque parece lógico que debería haber un número máximo permitido de espermatozoides en la región del disco germinal, este número parece ser mayor de 200; y a pesar de que es aceptado que se requiere solo una célula de esperma en el sitio apropiado para la fertilización, parece que es necesario un número mínimo de espermatozoides disponibles en la zona del disco germinal, para que ocurra la fertilización y el desarrollo exitoso del embrión²¹¹. Por otro lado Brillard y McDaniel, reportaron un aumento significativo de cerca del 4% de MET cuando el tiempo después de una inseminación artificial se extendió de una a dos semanas, independiente de la edad de las gallinas²¹² (35), lo que hace pensar que los factores que influyen negativamente la fertilidad, pueden también disminuir la incubabilidad por incremento de la MET.

²⁰⁹ CADIRCI S. Desinfection of hatching eggs by formaldehyde fumigation - A review. Arch fur Geflugelkd. 2009;73(2):116–23.

²¹⁰ BARNETT DM, KUMPULA BL, PETRYK RL, ROBINSON NA, RENEMA RA, ROBINSON FE. Hatchability and Early Chick Growth Potential of Broiler Breeder Eggs with Hairline Cracks. J Appl Poult Res. 2004;13(1):65–70.

²¹¹ BRAMWELL RK, MARKS HL, HOWARTH B. Op. Cit.

²¹² BRILLARD JP, MCDANIEL GR. Op. Cit.

También se debe mencionar que se han estimado correlaciones genéticas entre la infertilidad y la susceptibilidad a las diferentes etapas de ME y se ha encontrado que generalmente son favorables, es decir, que la selección para incrementar la fertilidad resulta en la disminución de la ME. Por el contrario, seleccionar para disminuir la ME puede terminar en un indirecto incremento de la fertilidad. Adicionalmente hay que tener en cuenta que la disminución en la susceptibilidad de muerte en una etapa disminuye, en menor medida, la susceptibilidad a morir en otras etapas²¹³. En otras palabras, es posible que el componente genético determine la relación entre fertilidad y ME, y esto explique los hallazgos del presente estudio, en el cual por cada incremento de una unidad porcentual de infertilidad, la ME incrementa entre 3 y 5% y, además, se mantiene una relación directamente proporcional entre las diferentes etapas de mortalidad.

Incluso, se encontró que la estirpe fue determinante de la METa y ME total, pues la estirpe Ross 308 resultó más susceptible a la ME que la Cobb 500. Esto coincide parcialmente con otro estudio en el que si se encontró diferencia, pero específicamente en infertilidad y MET²¹⁴. Sin embargo, con este aspecto es necesario ser cuidadosos, ya que de las 819 observaciones, solo 21 correspondieron a la estirpe Cobb 500, por lo tanto la comparación de los grupos podría ser cuestionable.

²¹³ BEAUMONT C, MILLET N, LE BIHAN-DUVAL E, KIPI A, DUPUY V. Genetic parameters of survival to the different stages of embryonic death in laying hens. *Poult Sci.* 1997;76(9):1193–6.

²¹⁴ DEEMING DC, VAN MIDDELKOOP JH. Op. Cit.

9. METODOLOGÍA PARA DETERMINAR INCIDENCIA DE MORTALIDAD EMBRIONARIA EN CAMPO

9.1 MUESTREO

9.1.1 Tipo de muestreo. Para la selección de los grupos de huevos se realizó un muestreo por conveniencia de un galpón para cada una de las categorías de edad establecidas en la guía de reproductoras Ross, teniendo en cuenta que los grupos seleccionados hubieran mostrado un comportamiento normal, según los parámetros establecidos por la guía, durante las dos semanas previas a la selección.

Estimación del parámetro de mortalidad embrionaria

En cada galpón seleccionado se realizó muestreo equiprobabilístico, por conglomerados monoetápico. Se asumió cada bandeja (de 162 huevos) como un conglomerado, se seleccionó aleatoriamente un número determinado de bandejas según la cantidad de huevos que resultaron del cálculo de la muestra y posteriormente se seleccionaron todos los huevos de la bandeja.

9.1.2 Tamaño de muestra. La muestra se calculó con la siguiente intención:

Estimación del parámetro de mortalidad embrionaria en cada uno de los galpones seleccionados para la prueba

Para cada grupo de huevos se calculó un tamaño de muestra según la incidencia de mortalidad establecida para cada edad en la guía de la estirpe.

Tabla 6: Mortalidad embrionaria para estirpe Ross 308, según edad de las reproductoras

Edad del lote	Mortalidad embrionaria esperada (%)	Infertilidad esperada (%)	Tamaño del grupo de huevos	Huevos calculados	Huevos totales incluido % de infertilidad	Cálculo bandejas	Bandejas evaluadas	Número de huevos evaluados
25-30 semanas	12	6	4860	825	875	5,40	6	972
31-45 semanas	8	2,5	4860	591	606	3,74	4	648
46-50 semanas	9	5	5994	661	605	4,29	5	810
51-60 semanas	11	8	3078	736	795	4,90	5	810

Fuente: AVIAGEN. Manual de manejo de la reproductora Ross

Teniendo en cuenta estos parámetros, se calculó la muestra para cada grupo, en Epidat 4.1, en el módulo de muestreo para una proporción, con una precisión de 3%, un error α de 0,05% y un efecto de diseño de 2, para estimar la proporción de mortalidad embrionaria total. Al número obtenido se sumó el porcentaje de infertilidad correspondiente a cada edad y al dividir entre la cantidad de huevos de las bandejas, se obtuvo el número de bandejas a evaluar, el cual se aproximó al entero superior para obtener así el total de huevos para el seguimiento. Los datos se presentan en la tabla 3.

9.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Un grupo de huevos de gallinas dentro del rango de cada categoría de edad
- Grupos de huevos de gallinas Ross 308

9.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Grupos de huevos provenientes de reproductoras que hayan presentado alguna enfermedad dentro de las cuatro semanas previas a la selección.

9.4 CAPTACIÓN Y SEGUIMIENTO

9.4.1 Manejo de las reproductoras. Aplica la misma descripción de manejo realizada en el apartado del estudio para factores asociados.

9.4.2 Recolección de información. La recolección de la información fue realizada por el investigador principal y se registraron los datos de mortalidad y algunas características de los grupos seleccionados en el formato diseñado para tal fin.

Para calcular el total de embriones muertos durante los 21 días de incubación se realizó seguimiento por ovoscopia de las bandejas seleccionadas los días 8 y 13. Cada bandeja se sacó cuidadosamente y se colocó sobre el ovoscopio. Los huevos claros se retiraron de la bandeja y se abrieron cuidadosamente por el polo ancho del huevo (cámara de aire). Se extrajo el contenido del huevo para determinar el estadio de muerte embrionaria, según las indicaciones de Hamburger y Hamilton para cada día de incubación²¹⁵ (54).

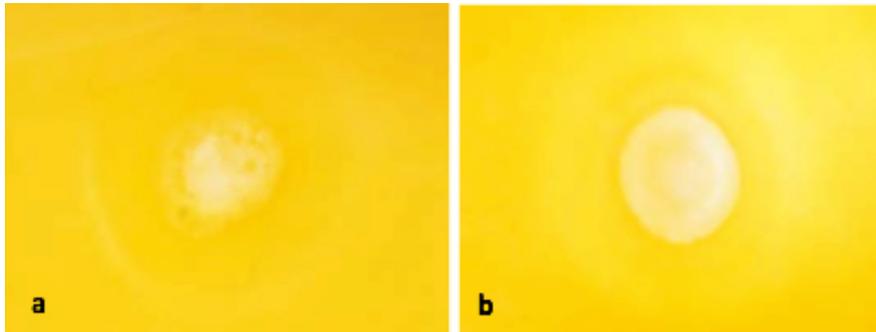
Figura 8: Selección de embriones muertos detectados por ovoscopia



²¹⁵ HAMBURGER V, HAMILTON HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol. 1951;88(1):49–92.

Se evaluaron cuidadosamente los huevos que no mostraron desarrollo superior a un día, para diferenciar adecuadamente la MET de la infertilidad, por medio de la observación del blastodisco o blastodermo.

Figura 9: Huevo infértil comparado con huevo fértil



a. Huevo infértil. El blastodisco se observa como un área blanca, densa e irregular de aproximadamente 2 mm de diámetro. B. Huevo fértil: El blastodermo se observa como un área densa, de 4 a 5 mm de diámetro y perfectamente redondeado. Tomado de AVIAGEN: Como investigar las prácticas de incubación. 2010.

El día de la eclosión de los pollos se realizó el embriodiagnóstico para evaluar la condición de los huevos que al final del período no eclosionaron. Se determinó el día de muerte y se consolidó la información, para obtener el número total de embriones muertos en cada grupo de huevos.

9.5 ANÁLISIS

9.5.1 Procesamiento de la información. La base de datos se creó en el programa Excel 2011 a partir del formato de mortalidad. Adicionalmente se registraron hallazgos relacionados con contaminación, malformaciones, malposiciones y fisuras en la cáscara.

Para el procesamiento y análisis estadístico, dicha base de datos se exportó al programa STATA® 11 para realizar el análisis de datos.

9.5.2 Análisis estadístico. Se analizó la curva de supervivencia para cada una de las edades con el método de Kaplan Meier y se compararon por medio de la prueba log-rank.

Se realizó una prueba de probabilidad binomial para comparar la frecuencia de mortalidad observada en la prueba de campo (total y en cada una de las etapas) con la frecuencia de mortalidad teórica, que en este caso correspondió a la mortalidad promedio (total y por etapas) de los datos de la población. Esto con el fin de establecer si la medición realizada diariamente por el personal de la incubadora coincide con la realizada en los grupos de prueba.

10. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Según el principio I de los Principios Directrices Internacionales para la Investigación Biomédica que Implice el Uso de Animales del CIOMS y el artículo 23 del capítulo VI de la Ley 84 de 1989 que adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales de la República de Colombia, se determina que el uso de animales en investigación está justificado en la medida que el fin sea el avance del conocimiento biológico y la protección de la salud y el bienestar de los mismos. Adicionalmente, el principio III del CIOMS y el mismo artículo del Estatuto reiteran que solo cuando existan indicios que consideren relevante la investigación, es posible usar animales.

Teniendo en cuenta esto, el estudio empleó el registro de datos obtenidos durante el manejo rutinario de las aves, en las diferentes granjas de reproductoras e incubadoras, sin manipulación que causara daño a los individuos. Es importante tener en cuenta que no es un estudio con fines experimentales, sino un estudio observacional que busca obtener experiencias necesarias para el control, prevención, diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades que afectan especies avícolas destinadas a consumo humano. Es por esta razón, que a pesar de que el principio II del CIOMS, el artículo 23 del estatuto y el artículo 87 de la Resolución 008430 de Octubre 4 de 1993 de la República de Colombia recomiendan el uso de métodos como modelos matemáticos, simulación por computadora y sistemas biológicos “in vitro” como primera opción, no es posible considerar estos sistemas como fuente de información para alcanzar el objetivo del estudio, ya que lo que se desea es determinar los diferentes factores de riesgo que hacen susceptibles a los individuos a morir durante el proceso de incubación en el contexto del sector avícola, que abastece el mercado nacional.

En consecuencia, no fue posible seleccionar especies de laboratorio, pero se garantizó que los animales usados en la investigación se consideraran como seres sensibles y se tuvo como imperativo ético su cuidado y uso apropiado para

evitarles o minimizarles el malestar, estrés o dolor. Para efectos de la investigación de campo se manipularon solo los huevos en los que se identificó la detención del desarrollo embrionario. Esto garantizó que no se violaran los principios V a IX de la Directriz, el artículo 24 del Estatuto y el artículo 87 de la Resolución.

Finalmente, para dar cumplimiento al principio X y XI de la Directriz y al artículo 87 de la Resolución, y según los artículos 1, 2, 3, 8 y 9 de la Declaración Universal de los Derechos de los Animales proclamada el 15 de octubre de 1978 y aprobada por la UNESCO y la ONU, se garantizó un trato respetuoso a los animales, teniendo en cuenta que nacen iguales ante la vida y tienen derecho a su existencia, por lo cual el hombre debe poner sus conocimientos al servicio del cuidado de los animales, sin someterlo a tratos crueles y garantizando las mejores condiciones de vida posible en su medio ambiente, con personal capacitado para su manipulación.

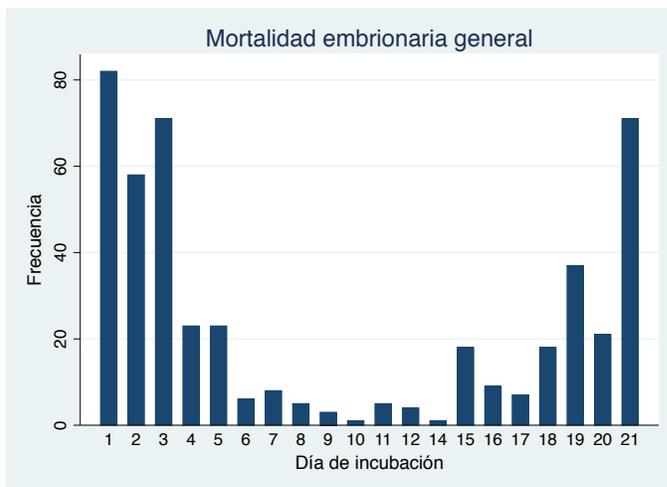
El presente protocolo se sometió a la evaluación por parte del comité de ética de la Universidad Industrial de Santander y se ejecutó con la aprobación de la empresa interesada.

Se declaró que no existía conflicto de interés en ninguno de los investigadores que participaron en el presente estudio, que pudiera comprometer su validez científica y ética.

11. RESULTADOS

Los 4 grupos de huevos seleccionados fueron de reproductoras de 28, 40, 47 y 64 semanas de edad. Se realizó seguimiento a 3240 huevos, de los cuales nacieron 2675 pollos que representaron una incubabilidad de 82,56% IC95%(81,25; 83,86). En total 2,90% de los huevos IC95% (2,32; 3,47) resultaron infértiles. De los 3146 restantes, murieron 471 embriones que se distribuyeron en los 21 días de incubación como se muestra en la gráfica 4, con una MET de 8,92%, MEI de 0,66% y METa de 6,5%; de ahí que en la primera semana ocurrió la mayor cantidad de muertes con el 57,53% de las mismas IC95%(53,05; 62,01), seguida de la tercera semana con 38,42% IC95%(34,01; 42,83), mientras que durante los días 8 a 14 de incubación solo murieron 19 embriones, lo que representó el 4,03% de las muertes IC95%(2,25; 5,81).

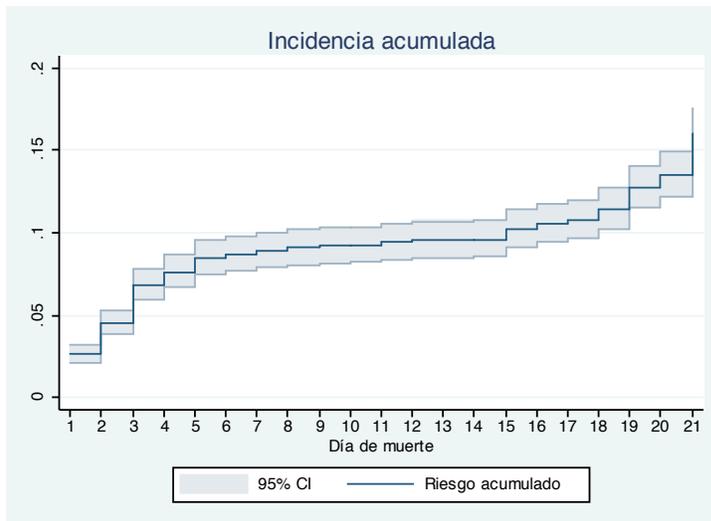
Gráfica 4: Número de embriones muertos en cada día de incubación



La incidencia acumulada de ME (calculada con el método de Kaplan Meier) fue de 16,08% IC95%(14,69; 17,60). Como se observa en la gráfica 5, las muertes ocurren especialmente durante los cuatro primeros días de incubación; luego de

alcanzar aproximadamente el 8 al 9% de la incidencia, la aparición de casos se reduce hasta que hacia el final de la incubación (día 18) vuelve a incrementarse la mortalidad.

Gráfica 5: Incidencia acumulada de ME



Como complemento de la incidencia, se calculó la probabilidad de supervivencia de los embriones (incubabilidad sobre huevos fértiles), y se estimó que el último día de incubación el 85,03% de los embriones fue capaz de eclosionar IC95%(83,73; 86,23).

Como otros hallazgos relevantes se encontró 2,61% IC95%(2,04; 3,16) de los embriones en posiciones anormales dentro de la cáscara. La malposición más frecuente fue la ubicación del pico sobre el ala derecha (tipo VI), con 48,78% IC95%(37,72; 59,83), seguida por el embrión rotado con la cabeza lejos de la cámara de aire (tipo IV), con 19,51% IC95%(10,75; 28,27), la cabeza por encima o por debajo del ala izquierda (tipo III) y las patas sobre la cabeza (tipo V), ambas con 13,41% y en menor proporción 3,65% con la cabeza en la punta del huevo (tipo II) y 1,21% con la cabeza entre los muslos (tipo I).

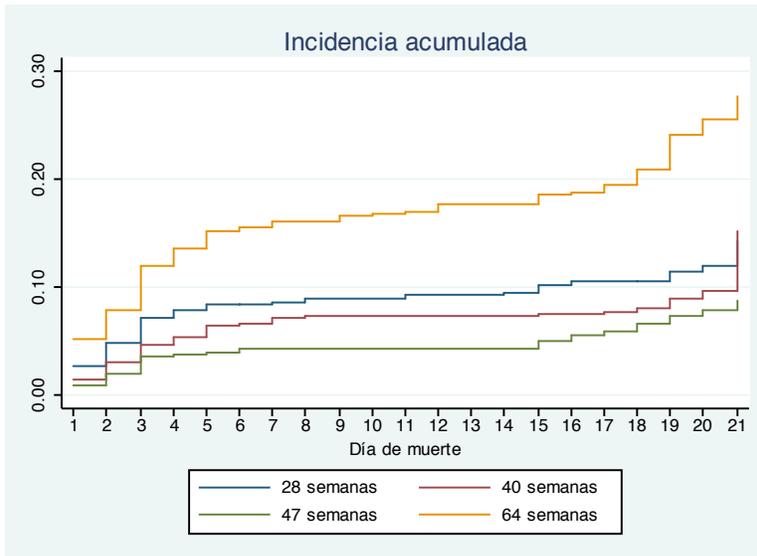
Se encontró una frecuencia de malformaciones de 0,54% IC95%(0,28; 0,79), representadas especialmente por deformidades en dos o más partes del cuerpo como el pico, las extremidades y/o la cabeza, las cuales alcanzaron el 58,82% IC95%(32,74; 84,90), seguidas por deformaciones visibles en una sola parte del cuerpo, como ausencia de uno o los dos ojos (23,52%) o presencia de hernia cerebral (17,64%).

También se observó un 2,09% IC95%(1,59; 2,59) de pollos que picaron la cáscara pero no lograron eclosionar. De estos, el 83,33% continuaban vivos cuando se abrió la cáscara, mientras que los restantes ya habían muerto.

Adicionalmente se encontraron 0,18% de los huevos con fisuras en la cascara IC95%(0,03; 0,33) y una contaminación bacteriana del 0,37% IC95%(0,16; 0,57).

En la tabla 7 se detalla la cantidad de embriones muertos en cada día de incubación para cada edad de las reproductoras. Al comparar la incidencia acumulada, se observa que la ME fue mayor en las reproductoras de 64 semanas con un total de 27,66% IC95%(23,92; 31,99), seguida por las reproductoras de 40 semanas con 15,23% IC95%(12,40; 18,70) y las de 28 semanas con 14,27% IC95%(12,00; 16,96), mientras que las reproductoras de 47 semanas mostraron el mejor desempeño con 8,84% IC95%(6,97; 11,22) de mortalidad, como se muestra en la gráfica 4. Las curvas no se solapan, excepto en el día 21 para el grupo de 40 semanas en el que murió un número importante de embriones, que incrementaron la mortalidad general en último momento.

Gráfica 6: Incidencia acumulada de ME para cada edad de las reproductoras



Al estimar la probabilidad de supervivencia (incubabilidad sobre fértiles) se encontraron valores complementarios a la incidencia acumulada de 75,53%, 85,69%, 86,59% y 91,50% para los embriones de reproductoras de 64, 40, 28 y 47 semanas, respectivamente. La prueba de Log-rank confirmó que existieron diferencias significativas entre las curvas de incidencia acumulada de cada edad ($p < 0,001$), generadas por el incremento de ME en embriones de reproductoras de 64 semanas que contrastó con el buen desempeño de los embriones de las reproductoras de 47 semanas.

El peso promedio de los huevos fue de 70,78g, 65,1g, 64,61g y 57,61g para las reproductoras de 64, 47, 40 y 28 semanas, respectivamente.

Tabla 7: Recuento de embriones muertos en cada día de incubación, para cada edad de las reproductoras

Edad	Total	Día de muerte																				Total	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21
28	972	26	21	21	5	5	1	1	4	0	0	3	0	0	1	6	3	0	1	7	4	20	129
40	648	9	10	10	5	6	1	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	5	4	32	91
47	810	8	8	12	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	2	5	6	4	7	68
64	810	39	19	28	11	10	2	4	0	3	1	2	4	0	0	6	1	4	9	19	9	12	183
FA	3240	82	58	71	23	23	6	8	5	3	1	5	4	0	1	18	9	7	18	37	21	71	471
IA		0,0 2	0,0 4	0,0 6	0,0 7	0,0 8	0,0 8	0,0 8	0,0 9	0,1 0	0,1 0	0,1 1	0,1 1	0,1 2	0,1 3	0,1 6							

FA: Frecuencia acumulada IA: Incidencia acumulada por Kaplan-Meier

Tabla 8: Otros hallazgos observados en la ovoscopia y en el embriodiagnóstico

Edad	Total	Infértil	Fisurado	Malposición						Malformación			PNN		Contaminación
				I	II	III	IV	V	VI	Múltiples	Ojos	Cerebro	Muertos	Vivos	
28	972	10	1	0	0	0	2	3	9	3	3	1	3	13	5
40	648	12	0	1	1	3	3	1	8	1	0	1	2	30	1
47	810	10	1	0	2	2	4	2	11	2	0	0	1	5	2
64	810	62	4	0	0	6	7	5	12	4	1	1	5	7	4
Total	3240	94	6	1	3	11	16	11	40	10	4	3	11	55	12
Proporción		0,029	0,002	0,0003	0,001	0,003	0,005	0,003	0,012	0,003	0,001	0,001	0,003	0,017	0,004

Como hallazgos adicionales se reportaron diferencias significativas en el porcentaje de infertilidad ($p < 0,001$), dadas por el 7,65% IC95%(5,81; 9,48) de huevos no fertilizados en las reproductoras de 64 semanas comparado con 1,02%, 1,85% y 1,23% de las reproductoras de 28, 40 y 47 semanas.

En el grupo de huevos de las reproductoras de 64 semanas se presentó 4,01% IC95%(2,60; 5,42) de embriones con alguna malposición, mientras que en los de reproductoras de 28 semanas este porcentaje fue de 1,45% IC95%(0,69; 2,21), 2,67% IC95%(1,41; 3,92) para los huevos de reproductoras de 40 semanas y 2,62% IC95%(1,51; 3,73) para los de 47 semanas; estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0,012$). Según la prueba exacta de Fisher, no hubo diferencia significativa en el tipo de malposiciones dentro de cada categoría de edad de las reproductoras ($p = 0,559$).

Respecto a las malformaciones, no hubo diferencias significativas en su porcentaje para cada edad de las reproductoras ($p = 0,328$), ni tampoco entre los tipos de malformación y las edades ($p = 0,720$).

Para los pollos que picaron la cáscara pero no lograron eclosionar se encontró diferencia ($p < 0,001$) en el porcentaje de las reproductoras de 40 semanas con 5,03% IC95%(3,32; 6,73%), frente a 1,66%, 0,75% y 1,60% de las reproductoras de 28, 47 y 64 semanas respectivamente. Además, fue diferente el porcentaje de embriones que se encontraron vivos respecto a los que ya habían muerto cuando se abrió la cáscara al momento del embriodiagnóstico para cada edad de las reproductoras ($p = 0,036$); esto es, aproximadamente 80% de embriones estaban vivos para las edades de 28 y 47 semanas, comparado con un 93% de embriones vivos en las reproductoras de 40 semanas y 60% en las de 64 semanas.

Por otro lado, aunque fue mayor el porcentaje de fisuras en los huevos de reproductoras de 64 semanas con 0,49% IC95%(0,01; 0,97), no hubo diferencias estadísticamente significativas con las otras edades ($p = 0,116$).

Además, los grupos de huevos con mayor porcentaje de contaminación fueron los de las reproductoras de semana 28 y 64 con aproximadamente 0,5%, pero no se observaron diferencias significativas con las otras edades ($p=0,565$).

Finalmente, se realizó el test de probabilidad binomial a dos colas (tabla 9), en el que la hipótesis nula fue que la probabilidad de muerte de los embriones fue el promedio de ME obtenida para cada etapa, según la edad, de los datos obtenidos de los embriodiagnósticos realizados por la empresa. Para el cálculo se consideró como n el número de huevos fértiles evaluados en el seguimiento, según la edad, y el número de eventos contabilizados fueron los embriones muertos en cada etapa, para cada edad.

Tabla 9: Valores p de la prueba binomial

Mortalidad Embrionaria*	Edad			
	25-30 semanas	31-45 semanas	46-50 semanas	51-64 semanas
Temprana	<0,001	0,104	0,657	<0,001
Intermedia	0,050	0,024	0,266	<0,001
Tardía	0,174	0,002	0,508	0,009
Total	0,097	<0,001	0,366	<0,001

* Se recategorizó la mortalidad de acuerdo a los rangos establecidos en el embriodiagnóstico: MET de 1 a 4 días, MEI de 5 a 11 días y METa del día 12 al 21.

Según estos valores p, escasamente los resultados del embriodiagnóstico de los huevos de las gallinas de la primera y la tercera categoría de edad fueron similares en su distribución, al seguimiento realizado personalmente en la incubadora por medio de ovoscopia y embriodiagnóstico.

12. DISCUSIÓN

Se encontró una incubabilidad del 82,56% que coincide con Alcorn (2008), quien reportó que cerca del 83% de los huevos producen pollos de primera calidad; además, reporta que la infertilidad es la causa del 20% de las fallas en la eclosión, lo cual concuerda con el presente estudio, donde 94 huevos de los 565 que no eclosionaron resultaron infértiles, es decir 16,64%²¹⁶, pero difiere de otros estudios en los que la infertilidad como causa de falla en la eclosión, contribuyó con 52,17%²¹⁷, y con 56,52% de los huevos que no produjeron pollos²¹⁸.

Respecto a esto, es muy importante diferenciar un huevo no fertilizado y uno con MET. En este estudio la fertilidad fue muy alta (97,1%) comparada con los estudios mencionados, en los que se alcanzó apenas un 88%. Esto influyó también en la diferencia de la proporción de fallas en la eclosión atribuida a la infertilidad, y podría plantear la duda sobre la correcta clasificación de los huevos infértiles y los embriones muertos el primer día de incubación.

Sin embargo, en contra de esta suposición existen dos estudios que compararon la inspección visual del huevo con un examen microscópico y encontraron que mientras que la probabilidad de clasificar un huevo fértil como infértil se mantuvo entre 2,7 y 3,7%, todos los huevos tratados como fértiles fueron correctamente clasificados^{219, 220}. Esta afirmación está relacionada con las lagunas que se observan en la periferia de una pequeña proporción de blastodermos fértiles, las cuales actúan como reflejo de diferentes grados de degeneración o subdesarrollo. Macroscópicamente estas lagunas alteran la particular forma definida del

²¹⁶ ALCORN MJ. Op. Cit.

²¹⁷ JASSIM EW, GROSSMAN M, KOOPS WJ, LUYKX RAJ. Multiphasic analysis of embryonic mortality in chickens. *Poult Sci.* 1996;75(4):464–71.

²¹⁸ KUURMAN W, BAILEY B, KOOPS W, GROSSMAN M. A model for failure of a chicken embryo to survive incubation. *Poult Sci.* 2003;82(2):214–22.

²¹⁹ KOSIN IL. Macro- and Microscopic Methods of Detecting Fertility in Unincubated Hen's Eggs. *Poult Sci.* 1944;23(4):266–9.

²²⁰ GOWE RS. Techniques for Identifying Fertile Hens' Eggs. *Poult Sci.* 1950;29(3):409–13.

blastodermo por lo que adoptan la apariencia de un blastodisco, con la consecuente clasificación errónea.

Aunque no se reporta lo contrario, es decir, que los huevos infértiles se puedan clasificar como fértiles sin serlo, hay que tener en cuenta que estos estudios se realizaron en huevos no incubados. El estudio supone qué pasaría si los huevos se revisaran el día 7 de incubación y concluye que el error de clasificar un huevo fértil como infértil se podría incrementar hasta 8,9% debido a que los embriones que murieron tempranamente podrían estar degenerados y ser clasificados entonces como infértiles²²¹. Respecto a que los huevos no fertilizados puedan ser clasificados erróneamente como fértiles el autor no hace alusión, pero se deduce que este error es casi inexistente porque la forma del blastodermo es tan característica que inevitablemente se clasifica correctamente. Por todo esto, es posible confiar en la medición de fertilidad obtenida en este estudio y considerar que en las granjas se cuenta con un adecuado manejo reproductivo de las aves, el cual permite obtener excelentes resultados en cuanto a huevos fertilizados disponibles para incubación.

Desde los primeros reportes de Payne en 1919 se observó que los embriones no morían uniformemente durante los 21 días de incubación, por el contrario, había dos periodos críticos: el primero entre los días 4 y 6 y el segundo entre los días 18 y 20 durante los que ocurría cerca del 65% de la mortalidad²²². A partir de esto, se desarrollaron modelos matemáticos multifásicos que buscaron caracterizar la distribución de la ME y ratificaron este patrón.

El primer modelo propuesto fue desarrollado en 1996 por Jassim et al., quienes realizaron predicciones de infertilidad, ME total y de la distribución acumulada de dos fases para el tiempo hasta la ME a partir de la suma de dos distribuciones logísticas. Estos autores encontraron una ME respecto al total de los huevos

²²¹ *Ibíd.*

²²² PAYNE LF. Distribution of Mortality During the Period of Incubation. *Poult Sci.* 1919;s2-6(2):9-12.

incubados de 11%²²³, que se acerca al porcentaje encontrado en el presente estudio, que fue de 14,54%. En otra aproximación, Kuurman et al. perfeccionaron el modelo predictivo usando una distribución de Weibull, a partir de una ME un poco mas baja, de 10%²²⁴.

Por otro lado, Jassim et al. determinaron que la primera fase tuvo el pico de ME el día 2, con una duración de 4,6 días, y la segunda fase tuvo su pico el día 18, con una duración de 4,8 días²²⁵. Lo anterior contrasta con el presente estudio, en el que el pico de ME para la primera fase fue el día 1 y duró aproximadamente 3 días y el pico en la segunda fase fue el día 21 y duró también 3 días. Esto permite establecer que aunque se mantiene el patrón bifásico, existen condiciones tanto de los huevos, como del manejo durante el proceso de incubación, que podrían afectar al embrión en diferentes estadios y adelantar o retrasar el pico de muerte en cada etapa, pero siempre asociado a cambios vitales tanto al inicio como al final de la incubación.

En el estudio de Payne también fue evidente que la tercera semana de incubación fue más crítica que la primera (con el 60% de las muertes después del día 14 de incubación)²²⁶, mientras que en este estudio fue la primera semana en la que se observó el mayor numero de muertes (57,54%). Algo semejante ocurrió en el estudio de Jassim et al., en el que se reportó entre 63 y 73% de mortalidad, pero incluyendo la segunda semana de incubación²²⁷.

En relación con lo anterior, es claro que tanto en incubación natural como artificial este patrón bifásico se repite. Según Payne, en los huevos que se incubaron de manera artificial el porcentaje de distribución de las muertes durante los días 4 al 6 fue de 16,1% mientras que en la incubación bajo la gallina el porcentaje fue de

²²³ JASSIM EW, GROSSMAN M, KOOPS WJ, LUYKX RAJ. Op. Cit.

²²⁴ KUURMAN W, BAILEY B, KOOPS W, GROSSMAN M. A. Op. Cit.

²²⁵ JASSIM EW, GROSSMAN M, KOOPS WJ, LUYKX RAJ. Op, Cit.

²²⁶ PAYNE LF. Op. Cit.

²²⁷ JASSIM EW, GROSSMAN M, KOOPS WJ, LUYKX RAJ. Op. Cit.

35,6%; así mismo, durante los días 18 a 20 la mortalidad fue de 56,9% en los huevos incubados artificialmente y de 32,6% en los huevos incubados naturalmente. Esto mostró que la incubación artificial fue más eficiente durante la primera semana de incubación, pero no así durante la última semana²²⁸.

El desempeño diferencial fue atribuido a posibles anomalías en la ventilación, la humedad y especialmente en la temperatura. Esta última se mantuvo constante en la incubadora, mientras que bajo la gallina fluctuó 6 °F durante las 24 horas del día de acuerdo con los cambios atmosféricos. Incluso, estas variaciones en el ambiente de incubación impactaban el crecimiento de microorganismos, ya que para ese momento (en el que apenas se estaban desarrollando las primeras incubadoras eléctricas) se reportaban más huevos contaminados a los 7 días de incubación bajo las gallinas, que en las incubadoras²²⁹; en otras palabras, el perfeccionamiento de los procesos artificiales de incubación permitió obtener pollo de un día de excelente calidad en grandes volúmenes, y además logró superar el desempeño de la incubación natural, con lo que contribuyó al crecimiento de una industria eficiente, que cada día mejora los parámetros de incubación y se empeña en controlar los puntos críticos que impactan el desarrollo adecuado del embrión y que cambian de acuerdo al manejo de los procesos de producción de huevo e incubación de pollo específicos de las empresas.

En este trabajo la MET fue 8,92%, que resultó menor a otro estudio, en el cual fue 16,4%²³⁰. Sin embargo, en Canadá el 8% fue considerado como un valor inusualmente alto que al igual que en este seguimiento excede los límites esperados para la primera semana de incubación²³¹. Además, este porcentaje también supera los valores máximos permitidos por la guía para la estirpe Ross 308, en la cual el mayor porcentaje aceptado de MET es de 5,5% cuando los

²²⁸ PAYNE LF. Op. Cit.

²²⁹ *Ibíd.*

²³⁰ THORNE MH, COLLINS RK, SHELDON BL. Chromosome analysis of early embryonic mortality in layer and broiler chickens. *Br Poult Sci.* 1991;32(4):711–22.

²³¹ SCOTT TA, MACKENZIE CJ. Incidence and classification of early embryonic mortality in broiler breeder chickens. *Br Poult Sci.* 1993;34(3):459–70.

huevos provienen de reproductoras entre 25 y 30 semanas de edad²³². Sin embargo, es importante tener en cuenta que estas guías son formuladas por la casa matriz de la estirpe bajo condiciones ideales de producción de huevos e incubación, que no pueden ser comparadas con el estilo de cría, levante y producción de Colombia.

Al detallar el momento de muerte de los embriones durante la primera semana, se observa que el pico de muerte fue el día 1, seguido de cerca por el día 3. En contraste, Scott evaluó específicamente la muerte en función de las etapas propuestas por Hamburguer y Hamilton y encontró un pico de muerte entre las etapas HH14 a HH18 y uno más bajo en las etapas HH24 y HH28.

El primero coincide con el presente estudio ya que estas etapas ocurren durante el día 3 de desarrollo y se relaciona con cambios que incluyen la formación del amnios y del corazón y el sistema circulatorio; el segundo pico coincide con los días 4 y 5 de incubación y se relaciona con posibles alteraciones en la formación de los arcos viscerales²³³, la fusión del corion y la alantoides y el inicio del funcionamiento del mesonefros²³⁴. Esto concuerda con la caracterización dada por los modelos multifásicos anteriormente mencionados, pero difiere con el actual estudio en lo relacionado con la inusual mortalidad del día 1, lo cual se intentará explicar más adelante en el texto.

En cuanto a la MEI, en esta investigación se encontró una incidencia de 0,66%, lo cual se mantiene dentro de los límites de la guía de incubación para Ross 308, donde el máximo permitido es de 1%²³⁵. Durante la segunda semana de incubación comienza la mineralización de los huesos, se establece la actividad de hormonas secretadas por órganos como la tiroides, la pituitaria y las gónadas, y

²³² TULLETT S. Op. Cit.

²³³ SCOTT TA, MACKENZIE CJ. Incidence and classification of early embryonic mortality in broiler breeder chickens. Br Poult Sci. 1993;34(3):459–70.

²³⁴ LIPTÓI K, HIDAS A. Op. Cit.

²³⁵ TULLETT S. Op. Cit.

los nutrientes se movilizan activamente desde la albumina y progresivamente desde el vitelo²³⁶. Por estos motivos, un buen estatus nutricional de los lotes es vital para transferir al huevo un suministro adecuado y equilibrado de nutrientes necesarios para el desarrollo del embrión²³⁷ y excesos o deficiencias de ciertos nutrientes incidirán en la mortalidad durante la segunda semana de incubación.

La METa en este estudio fue de 6,5%, que excede el reportado por otros autores^{238,239,240}, y por la guía de incubación, en la cual el máximo permitido es de 4,5% (incluidos los embriones que pican la cáscara) para las reproductoras de 25 a 30 semanas²⁴¹. Sin embargo, coincide con la mortalidad encontrada en huevos que fueron almacenados durante largo tiempo^{242,243} o en huevos incubados que tenían la cáscara fisurada²⁴⁴.

Esta última semana de incubación mostró un pico el día 19, lo que concuerda con lo evidenciado en los modelos multifásicos^{245,246}. Hasta este momento los vasos sanguíneos alantoideos cumplen la función de respiración y excreción de desechos, pero cuando el embrión rompe con el pico las membranas de la cáscara y accede a la cámara de aire, la respiración pulmonar se completa²⁴⁷, y cualquier falla en esta transición puede interferir con la eclosión exitosa del

²³⁶ HAMBURGER V, HAMILTON HL. Op. Cit.

²³⁷ WILSON HR. Op. Cit.

²³⁸ LOURENS A, MOLENAAR R, VAN DEN BRAND H, HEETKAMP MJW, MEIJERHOF R, KEMP B. Op. Cit.

²³⁹ ELIBOL O, BRAKET J. Op. Cit.

²⁴⁰ ELIBOL O, BRAKE J. Effect of Flock Age, Cessation of Egg Turning, and Turning Frequency Through the Second Week of Incubation on Hatchability of Broiler Hatching Eggs. *Poult Sci.* 2006;85(8):1498–501.

²⁴¹ TULLETT S. Op. Cit.

²⁴² KHAN MJA, KHAN SH, BUKHSH A, ABBASS MI, JAVED M. Op. Cit.

²⁴³ SCHÄFER A, DREWES W, SCHWÄGELE F. Op. Cit.

²⁴⁴ BARNETT DM, KUMPULA BL, PETRYK RL, ROBINSON NA, RENEMA RA, ROBINSON FE. Op. Cit.

²⁴⁵ JASSIM EW, GROSSMAN M, KOOPS WJ, LUYKX RAJ. Op. Cit.

²⁴⁶ KUURMAN W, BAILEY B, KOOPS W, GROSSMAN M. Op. Cit.

²⁴⁷ PAYNE LF. Op. Cit.

embrión²⁴⁸. También, puede estar asociado a otros cambios que ocurren después del día 16 y que pueden contribuir a debilitar los embriones menos vigorosos. El primer cambio se refiere a que los nutrientes del embrión son obtenidos principalmente de la albumina y después del día 16, el embrión empieza a depender de la yema. Además, hacia el día 19 la yema no se ha absorbido pero se encuentra en el proceso de pasar dentro de la cavidad abdominal²⁴⁹ y esto puede alterar la viabilidad del embrión.

Las posibles causas que incrementan la ME son múltiples. Algunas investigaciones se han enfocado, por ejemplo, en anomalías cromosómicas que están ligadas a las estirpes y pueden variar desde 0,4% hasta 12%, afectando especialmente a aquellas productoras de carne, en las que se alcanza una incidencia de 4 a 8%, e incluso puede sobrepasar el 12% en estirpes seleccionadas específicamente para incrementar la tasa de crecimiento y el peso corporal²⁵⁰.

Muchas de estas anomalías, representadas por genes autosómicos o genes recesivos letales ligados al sexo y aberraciones cromosómicas asociadas a meiosis anormales, fertilización o clivaje temprano²⁵¹ que incluyen haploidia, triploidia, aneuploidia, tetraploidia y translocaciones, están asociadas con retardo en el crecimiento, malformaciones y MET. No obstante, son responsables en promedio del 11,8% de MET en pollos de engorde, con un rango de 4,4% a 28,1%, lo cual significa que son responsables de solo una parte de la MET e indica que existen otros factores que son más significativos en su contribución a estas pérdidas²⁵².

²⁴⁸ A ROMANOFF AL. Op. Cit.

²⁴⁹ PAYNE LF. Op. Cit.

²⁵⁰ THORNE MH, COLLINS RK, SHELDON BL. Op. Cit.

²⁵¹ SAVAGE TF, DEFRANK MP, BREAN SE. Op. Cit.

²⁵² THORNE MH, COLLINS RK, SHELDON BL. Op. Cit.

En el caso de este estudio, no se puede especificar el compromiso de la genética en la contribución a la ME ya que solo se hizo seguimiento a huevos de una estirpe. Sin embargo, como se ha mencionado, es inevitable encontrar alteraciones cromosómicas en estirpes, que como la Ross 308 se han seleccionado tan cuidadosamente para mejorar el rendimiento cárnico ya que a pesar de que los padres tengan fenotipo y cariotipo normal cualquiera de estas alteraciones son propensas a ser heredadas por la progenie²⁵³. Además, cuando la crianza y la tecnología de incubación son óptimas y aún se produce ME, está justificado evaluar a fondo los antecedentes genéticos ya que la misma puede ser heredada, y al acumularse en el lote puede afectar los parámetros de producción²⁵⁴.

Respecto a esto, las malformaciones observadas en el embriodiagnóstico podrían ser un reflejo de alteraciones genéticas menos letales y que permiten el desarrollo del embrión hasta estadios más avanzados en la incubación. Sin embargo, es un error garantizar que los embriones con alguna malformación están relacionados con anomalías genéticas, ya que se sabe que en mayor proporción se relacionan con condiciones adversas de incubación como temperatura anormal, exceso o restricción de O₂ y excesivas cantidades de CO₂²⁵⁵. Aún así, el porcentaje de embriones con anomalías estructurales (como anoftalmia, exencefalia o alteración en las extremidades) fue 0,54%, valor que podría considerarse muy bajo como para atribuirse exclusivamente a condiciones de manejo anormales. De ser así, podría esperarse un mayor número de embriones afectados, lo cual no concuerda con los hallazgos del presente estudio y permite considerar que hay una relación entre las malformaciones y el factor genético.

Por otro lado, las malformaciones están ligadas íntimamente con la MET. En un estudio se reportaron defectos en el corazón, la cabeza, los ojos, el tórax, entre otros órganos vitales de embriones que murieron en estadio de anillo de sangre

²⁵³ SAVAGE TF, DEFRANK MP, BREAN SE. Op. Cit.

²⁵⁴ LIPTÓI K, HIDAS A. Op. Cit.

²⁵⁵ A ROMANOFF AL. Op. Cit.

con embrión visible. Fue evidente que los embriones de estirpes de pollo de engorde presentaron una mayor cantidad de anomalías estructurales comparadas con los de estirpes de ponedora comercial²⁵⁶. Esto, sin embargo, no pudo observarse en esta investigación, ya que solo se realizó inspección visual y en estadios de desarrollo temprano no siempre es factible observar en detalle estas anomalías.

Dentro de los factores que si permite evaluar este estudio se encuentra la edad de las reproductoras, aspecto que es determinante en la evaluación de la ME y ha sido ampliamente discutido en múltiples estudios experimentales^{257 258 259 260 261 262 263}. La ME fue más alta en los huevos de las reproductoras de 64 semanas, seguida de las de 40, 28 y 47 semanas. Este comportamiento es atribuido, entre otras cosas, a diferencias en el peso del huevo y la calidad de la cáscara medida por variables como la gravedad específica, el grosor, la conductancia y/o la porosidad²⁶⁴.

²⁵⁶ SCOTT TA, MACKENZIE CJ. Op. Cit.

²⁵⁷ ELIBOL O, BRAKE J. Op. Cit.

²⁵⁸ ALMEIDA J, VIEIRA S, REIS R, BERRES J, BARROS R, FERREIRA A, et al. Hatching distribution and embryo mortality of eggs laid by broiler breeders of different ages. *Rev Bras Ciência Avícola*. 2008 J;10(2):89–96.

²⁵⁹ YANNAKOPOULOS AL, TSERVENI-GOUSHI AS. Relationship of Parents' Age, Hatching Egg Weight, and Shell Quality to Day-Old Chick Weight as Influenced by Oviposition Time. *Poult Sci*. 1987;66(5):829–33.

²⁶⁰ REIS LH, GAMA LT, SOARES MC. Effects of short storage conditions and broiler breeder age on hatchability, hatching time, and chick weights. *Poult Sci*. 1997;76(11):1459–66.

²⁶¹ GUALHANONE A, FURLAN R, FERNANDEZ-ALARCON M, MACARI M. Effect of breeder age on eggshell thickness, surface temperature, hatchability and chick weigh. *Rev Bras Ciência Avícola*. 2012;14(1):09–14.

²⁶² ULMER-FRANCO AM, FASENKO GM, O'DEA CHRISTOPHER EE. Hatching egg characteristics, chick quality, and broiler performance at 2 breeder flock ages and from 3 egg weights. *Poult Sci*. 2010;89(12):2735–42.

²⁶³ ROBERTS JR, CHOUSALKAR KK. Effect of production system and flock age on egg quality and total bacterial load in commercial laying hens. *J Appl Poult Res*. 2014;23(1):59–70.

²⁶⁴ PEEBLES ED, BRAKE J. Eggshell Quality and Hatchability in Broiler Breeder Eggs,. *Poult Sci*. 1987;66(4):596–604.

Se ha reportado que la cáscara generalmente adelgaza con la edad²⁶⁵ y que las gallinas jóvenes tienden a producir huevos con cáscara más gruesa que las gallinas viejas. Aunque no se midió la calidad de la cáscara en este estudio, si fue evidente que los huevos de las gallinas de 64 semanas se fracturaban más fácilmente, tuvieron el mayor porcentaje de huevos fisurados aunque sin diferencias con las otras edades, y también la cáscara era en general más delgada y con imperfecciones del color y la textura. Esto fue acorde con otro estudio en el que se asoció el aumento de la edad con pobre calidad de la cáscara, representada por incremento de incidencia de huevos con gránulos y cáscara delgada, lo que probablemente se debe a que el huevo aumenta su tamaño pero la deposición de cáscara se mantiene constante²⁶⁶.

Por su parte, otro estudio encontró una fuerte asociación entre la MET y la gravedad específica, particularmente en gallinas viejas, según la cual con gravedades menores a 1.080, los embriones murieron más, lo que se atribuyó a una mayor pérdida de agua de huevos por el adelgazamiento de la cáscara²⁶⁷. Aunque la gravedad específica no se evaluó, las características físicas evidenciadas podrían ser un reflejo de su disminución, que finalmente pudo haber impactado la MET en huevos de reproductoras de 64 semanas, la cual resultó ser la más alta de todas las edades evaluadas.

La incubabilidad generalmente es máxima en la porción media de la etapa productiva cuando el grosor de la cáscara disminuye y la porosidad se incrementa²⁶⁸, lo que concuerda con este estudio en el que los mejores resultados fueron de los huevos de reproductoras de 47 semanas. Por otro lado, el engrosamiento de la cáscara puede llegar a incrementar especialmente la MET porque hay menor porosidad y además la distribución de los poros tiende a estar

²⁶⁵ ROLAND DA. Factors Influencing Shell Quality of Aging Hens. *Poult Sci.* 1979;58(4):774–7.

²⁶⁶ *Ibíd.*

²⁶⁷ MCDANIEL GR, ROLAND DA, COLEMAN MA. The Effect of Egg Shell Quality on Hatchability and Embryonic Mortality. *Poult Sci.* 1979;58(1):10–3.

²⁶⁸ PEEBLES ED, BRAKE J. *Op. Cit.*

hacia el ecuador y el polo agudo del huevo, en contraste con mayor porosidad en el polo ancho de los huevos de los pollos que logran eclosionar²⁶⁹. Esto podría estar relacionado con el hallazgo de este estudio según el cual los embriones de las reproductoras de 28 semanas tuvieron la segunda mayor incidencia de MET ya que huevos con las características mencionadas son típicos de reproductoras que inician el ciclo de producción.

También se ha encontrado una correlación positiva entre la edad del lote y el tamaño del huevo²⁷⁰ a consecuencia de un incremento en la deposición de yema ocasionado por cambios en la función ovárica influenciados por la edad²⁷¹, que se traducen en incremento del peso del folículo, y por ende en mayor peso del huevo. Lo anterior fue obvio en este seguimiento en el que los huevos más grandes y más pequeños fueron los de las reproductoras de 64 y 28 semanas, respectivamente.

Adicionalmente, el tamaño del huevo está correlacionado con el tamaño del embrión, por lo cual se espera que de huevos grandes se obtengan pollos grandes²⁷². Probablemente estos pollos grandes tienen un alto contenido de agua y mayores posibilidades de sobrevivir que pollos provenientes de huevos pequeños ya que la relación superficie-volumen de huevos grandes es menor, lo que permite que estos huevos pierdan agua relativamente menos rápido y esta agua extra puede ser incorporada a los tejidos embrionarios²⁷³. Sin embargo, esto también puede ser perjudicial, ya que si se incuban huevos grandes y huevos pequeños bajo similares circunstancias, la alta producción de calor y las

²⁶⁹ PEEBLES ED, BRAKE J. Relationship of Eggshell Porosity to Stage of Embryonic Development in Broiler Breeders. *Poult Sci.* 1985;64(12):2388–91.

²⁷⁰ GUALHANONE A, FURLAN R, FERNANDEZ-ALARCON M, MACARI M. Op. Cit.

²⁷¹ BAHR JM, PALMER SS. The influence of aging on ovarian function. *Crit Rev Poult Biol.* 1989;2(2):103–10.

²⁷² HALBERSLEBEN DL, MUSSEHL FE. Relation of Egg Weight to Chick Weight at Hatching. *Poult Sci.* 1922;1(4):143–4.

²⁷³ RICKLEFS RE, HAHN DC, MONTEVECCHI WA. The Relationship between Egg Size and Chick Size in the Laughing Gull and Japanese Quail. *The Auk.* 1978;95(1):135–44.

dificultades para transferirlo, en huevos grandes puede resultar en alta temperatura de los embriones²⁷⁴.

Incluso el peso y el grosor de la cáscara están correlacionados negativamente con la tasa relativa de pérdida de agua del huevo. Con respecto a esto, se cree que el principal mecanismo osmoregulador del embrión en desarrollo es la membrana corioalantoidea con su transporte activo de iones de sodio del fluido alantoideo a la sangre y el posterior movimiento pasivo de agua. Esta membrana permite el reciclaje de agua del líquido alantoideo de nuevo a la circulación embrionaria para preservar las condiciones osmóticas en la sangre y el fluido alrededor del embrión²⁷⁵.

Con una mayor pérdida de agua, el volumen del líquido alantoideo es menor y el transporte de sodio está incrementado; por el contrario, con una menor pérdida de agua, el volumen alantoideo es mayor y la tasa de transporte de sodio disminuye. También, la alta pérdida de agua afecta el contenido de iones del plasma y el fluido amniótico solo después de que el fluido alantoideo es mínimo²⁷⁶.

La membrana corioalantoidea se atrofia el día 17 y deja de funcionar al final del día 18, por lo cual el periodo entre el día 19 y la eclosión es crítico; si durante la incubación se ha perdido gran cantidad de agua, se acelera la disminución del líquido alantoideo lo que hace que la membrana corioalantoidea colapse alrededor del embrión antes de lo habitual y se prolongue el periodo de estrés osmótico, lo que causa deshidratación del embrión e incremento de la mortalidad²⁷⁷.

Cuando la pérdida de agua durante la incubación es mínima, no hay signos de estrés osmótico en la sangre ni en el líquido amniótico del embrión y no se afecta

²⁷⁴ MEIJERHOF R, VAN BEEK G. Op. Cit.

²⁷⁵ GRAVES JS, DUNN BE, BROWN SC. Embryonic chick allantois: functional isolation and development of sodium transport. *Am J Physiol.* 1986;251(5 Pt 1):C787-94.

²⁷⁶ DAVIS TA, SHEN SS, ACKERMAN RA. Op. Cit.

²⁷⁷ DAVIS TA, ACKERMAN RA. Effects of increased water loss on growth and water content of the chick embryo. *J Exp Zool Suppl.* 1987;1:357-64.

el crecimiento embrionario. Sin embargo el exceso de agua permanece en el albumen, el cual no puede ser utilizado por el embrión, resultando en la disminución de su contenido de proteína. Estos embriones logran picar la cáscara, pero no eclosionan, lo que puede ser atribuido a un acúmulo de CO₂ o al resultado de la limpieza incompleta del líquido pulmonar debido al pequeño volumen de la cámara de aire de estos huevos²⁷⁸. Hallazgos de albumina residual fueron evidentes en algunos embriones que murieron hacia el final de la incubación, y aunque no se cuantificaron, es una característica que se tienen en cuenta en el embriodiagnóstico, ya que esto puede estar relacionado además con condiciones adversas de incubación.

Otro aspecto relacionado con la edad y el incremento de ME es la diferencia en el desarrollo de los embriones asociada a la secuencia de puesta del huevo, la cual hace referencia al patrón de producción determinado por días en los que la gallina pone huevos consecutivamente, seguidos de una “pausa” de aproximadamente 44 horas producida por el retraso en la ovulación del folículo F1. La ovulación es inducida por la hormona luteinizante (LH), la cual es dependiente de la progesterona producida por el folículo maduro durante 6 a 10 horas de “periodo abierto”; sólo en este período, el hipotálamo es capaz de responder a la señal de la progesterona, por lo tanto si el folículo no madura durante este periodo, no se producen adecuadas cantidades de progesterona para que se induzca el pico de LH requerido para la siguiente ovulación²⁷⁹.

El folículo destinado a ser el primer huevo de la nueva secuencia permanece en el ovario cerca de 16 horas más que los siguientes folículos, y consecuentemente se ha encontrado que el primer embrión de la secuencia tiende a ser más desarrollado que los siguientes embriones, aunque no se ha esclarecido la causa. Aún así, se ha observado baja incubabilidad en estos huevos, lo que podría deberse al envejecimiento pre-ovulatorio del oocito, o a cambios en la composición

²⁷⁸ DAVIS TA, SHEN SS, ACKERMAN RA. Op. Cit.

²⁷⁹ ROBINSON; F.E. Management for control of ovarian development in broiler breeders. The poultry informed professional. 2002; 59: 1–7.

de la yema que afectan el crecimiento embrionario. Esto muestra que no necesariamente los embriones más desarrollados al momento de la ovoposición garantizan una buena incubabilidad²⁸⁰.

Teniendo en cuenta que la duración de la secuencia de puesta del huevo normalmente disminuye a medida que finaliza el periodo de producción de la parvada, se puede relacionar la baja incubabilidad, con el incremento en la incidencia de primeros huevos de las secuencias de puesta en lotes que envejecen²⁸¹, por lo tanto, los embriones tienden a presentar estadios de desarrollo más adelantados, pero los huevos presentan reducida fertilidad e incubabilidad, lo que puede ser atribuido también a factores como la disminución de la habilidad de las gallinas para retener los espermatozoides en las glándulas de almacenamiento de semen, baja calidad del folículo o envejecimiento preovulatorio del folículo²⁸². Lo anterior concuerda con el hecho de que la mayor incidencia de ME y de infertilidad fue de los huevos de reproductoras de 64 semanas.

Las malposiciones evidentes cerca del final de la incubación son causa reconocida de METa. De los embriones que murieron a partir del día 18, casi el 50% presentaron alguna malposición que hizo extremadamente difícil o imposible la eclosión porque el pollo no pudo acceder a la cámara de aire, fue incapaz de perforar la cáscara por restricción del movimiento, o por la combinación de ambas razones. Se estima que cerca del 1 al 4% de los embriones a los 18 días de incubación tienen alguna malposición²⁸³ y que las malposiciones en embriones de 18 días o más, fueron responsables del 24.4% de la mortalidad total²⁸⁴, similar a cerca del 20% del que fueron responsables en este estudio.

²⁸⁰ FASENKO GM, HARDIN RT, ROBINSON FE, WILSON JL. Op. Cit.

²⁸¹ REIJRINK IA, MEIJERHOF R, KEMP B, VAN DEN BRAND H. Op. Cit.

²⁸² FASENKO GM, HARDIN RT, ROBINSON FE, WILSON JL. Op. Cit.

²⁸³ NORTH MO, BELL DD. Commercial chicken production manual. Cuarta edición. New York: Springer; 1990.

²⁸⁴ HUTT FB, CAVERS JR. The lethal nature of certain malpositions of the chick embryo. Poul Sci. 1931;10:403-4.

Se cree que la incidencia de malposiciones puede incrementar por factores ambientales tales como temperatura anormal y exceso de CO₂ atmosférico, lo que hace pensar que la malposición no siempre es la causa primaria de muerte, sino también puede ser secundaria a condiciones ambientales desfavorables o a otros factores letales (por ejemplo, es probable que la genética sea causa de una pequeña parte de las malposiciones)^{285,286}.

Los embriones giran la cabeza entre el día 16 y 19 de incubación, dejando el pico bajo el ala derecha y el lado izquierdo de la cara sobre el pecho²⁸⁷. El proceso de girar la cabeza es más difícil en huevos incubados con el extremo ancho hacia arriba, probablemente porque no solo se requiere girar la cabeza sino también levantarla en contra de la gravedad, por lo cual, cuando el embrión es incapaz de hacerlo, la cabeza queda en la malposición I, evento que no ocurre cuando el huevo está inclinado u horizontal (respecto al eje longitudinal del huevo). Por este motivo, esta posición se ha asociado a fallas en el volteo del huevo entre los días 14 a 18 de incubación²⁸⁸ y generalmente es letal²⁸⁹. Esta malposición I fue la menos frecuente y al estar tan estrechamente relacionada con el volteo del huevo, podría explicarse porque las incubadoras cuentan con un mecanismo de volteo efectivo que facilita que el embrión se posicione correctamente dentro del huevo.

La ubicación normal para el desarrollo del cuerpo del embrión es hacia el extremo ancho del huevo y se alcanza entre el día quinto y noveno de incubación²⁹⁰. Es fácil de alcanzar cuando el huevo se pone con este extremo hacia arriba, ya que el embrión y la yema quedan flotando hacia este lado. Esta posición está establecida

²⁸⁵ A ROMANOFF AL. Op. Cit.

²⁸⁶ SANCTUARY WC. Op. Cit.

²⁸⁷ KUO ZY. Ontogeny of embryonic behavior in aves. II. The mechanical factors in the various stages leading to hatching. J Exp Zool. 1932;62(2):453–87.

²⁸⁸ HUTT FB, PILKEY AM. Studies in Embryonic Mortality in the Fowl, V. Relationships Between Positions of the Egg and Frequencies of Malpositions. Poult Sci. 1934;13(1):3–13.

²⁸⁹ SANCTUARY WC. Op. Cit.

²⁹⁰ KUO ZY. Op. Cit.

dentro del protocolo de incubación de la empresa, lo que se refleja en una muy baja incidencia de esta malposición; ya que al contrario, cuando el huevo es puesto con el extremo agudo hacia arriba durante este periodo crítico, es probable encontrar una mayor incidencia de malposición II²⁹¹. Además, es posible que cuando la alantoides se adhiere a la membrana de la cáscara, se limita el movimiento del embrión y esto puede fijar la posición. La letalidad varía; en un estudio se encontró que el 43,4% de huevos en esta posición eclosionaron y que los embriones en posición normal tienen dos veces la posibilidad de eclosionar comparados con los embriones en malposición II²⁹².

En cuanto a la malposición III, que afecta alrededor del 20% de los embriones de 18 días, se relaciona con la genética, la dieta y los embriones con malformaciones²⁹³. Se observa con mayor frecuencia en huevos incubados con el polo ancho hacia arriba y además, esta posición se asocia con el tamaño del huevo. En un estudio, la frecuencia de mortalidad por esta malposición aumentó con el tamaño del huevo y la incidencia de la malposición en los embriones muertos fue 20,14% en huevos con un peso mayor de 60 gramos, siendo más de 5 veces la incidencia en huevos menores de 52 gramos²⁹⁴. De igual modo, en este seguimiento se encontró un mayor número de embriones con esta malposición, en huevos de gallinas de 64 semanas, que eran los de mayor tamaño, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a las demás edades. Esta posición es letal, ya que aunque en ocasiones el embrión logra perforar la cáscara, no puede rotar adecuadamente para continuar con esta operación y no logra eclosionar²⁹⁵.

²⁹¹ HUTT FB, PILKEY AM. Op. Cit.

²⁹² BYERLY TC, OLSEN MW. Time and Manner of Determination of the Malposition Head in small end of egg. *Poult Sci.* 1933;12(4):261–5.

²⁹³ BYERLY TC, OLSEN MW. Causes of the Embryonic Malposition Head-Under-Left-Wing. *Poult Sci.* 1934;13(5):278–82.

²⁹⁴ HUTT FB. Embryonic Mortality in the Fowl: VII. On the Relation of Malpositions to the Size and Shape of Eggs. *Poult Sci.* 1938;17(4):345–52.

²⁹⁵ BYERLY TC, OLSEN MW. Op. Cit.

La malposición IV se ha asociado a huevos incubados en forma horizontal y a huevos que son volteados más allá del día 18 de incubación, en los cuales es posible que se induzca una rotación de la cabeza, que es difícil de corregir por el embrión, ya que el espacio para el final de la incubación se ha reducido al mínimo²⁹⁶. Esta fue la segunda malposición más frecuente en el presente estudio, aunque no coincide con las causas mencionadas anteriormente, ya que las máquinas no permiten la incubación de los huevos en posición horizontal respecto a su eje longitudinal y además después de la transferencia el día 18, los huevos no se voltean, por lo tanto se debe ahondar más en las posibles causas de este evento.

La malposición V se caracteriza porque una o ambas patas quedan atrapadas entre la cabeza y el cascarón y se impide los movimientos de la cabeza hacia atrás para tomar el impulso que se requiere para picar el cascarón. Además, las patas también participan en la rotación final del embrión a medida que él corta la parte superior del cascarón para poder salir del huevo. De esta manera, si la posición de las patas sobre la cabeza no impide el picoteo del cascarón, sí puede impedir la rotación final y la eclosión del pollo. La incidencia de esta posición puede alcanzar el 20% del total de las malposiciones embrionarias²⁹⁷ lo que se acerca al presente estudio en el que se alcanzó 14%.

La malposición VI es la más común ya que puede llegar a alcanzar el 50% de las malposiciones y la mayoría de los embriones alcanzan a nacer²⁹⁸. Lo anterior se confirmó en este seguimiento, ya que cerca del 48% de las malformaciones fueron de ese tipo. En este caso se limita los movimientos de la cabeza, lo que hace que los golpes del pico estén mal dirigidos y generalmente los huevos se encuentran picados hacia el extremo grande del huevo, lo que no es usual²⁹⁹.

²⁹⁶ HUTT FB, PILKEY AM. Op. Cit.

²⁹⁷ TULLETT S. Op. Cit.

²⁹⁸ *Ibíd.*

²⁹⁹ HUTT FB, PILKEY AM. Op. Cit.

13. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Existen dos tipos de variables que se midieron en este estudio: las agregadas y las ambientales. Las primeras hacen referencia al resumen de las características de los individuos en el grupo (como la incidencia de mortalidad embrionaria, malformaciones y malposiciones, entre otras); y las ambientales hacen referencia a las características físicas del lugar de procedencia de los grupos de huevos (temperatura, transporte)³⁰⁰. En relación con esto, hay que mencionar que una limitación de este estudio fue dificultad de medir algunas variables, y el grado de certeza que se tuvo sobre su validez. Específicamente, este estudio tomó datos de fuentes secundarias, que no garantizaron su calidad.

Por un lado, esto significa que el análisis de los factores se realizó sobre mediciones inexactas de incidencia de mortalidad, pero teniendo en cuenta que esta es la manera en que regularmente se manejan los datos en la incubadora, significa que cualquier decisión que se toma siempre se evalúa con la misma forma de medición y esto puede representar, en la práctica, una ventaja para la empresa al momento de implementar cambios y medir el impacto generado por los mismos.

Por el otro lado, la prueba de campo que se realizó permitió hacer una descripción adecuada de la curva de mortalidad basada en mediciones más detalladas, pero además permitió evaluar si esta incidencia obtenida es comparable o no con la incidencia que se reporta en los datos de la población, y si el método de medición en la práctica diaria es adecuado.

Respecto a esto, la mortalidad en todas las etapas fue comparable en los huevos de gallinas de 46 a 50 semanas de edad, mientras que para las de 25 a 30

³⁰⁰ DIEZ-ROUX A V. Bringing context back into epidemiology: variables and fallacies in multilevel analysis. *Am J Public Health*. 1998;88(2):216–22.

semanas fue similar excepto para la MET. Para las otras dos categorías de edad (31 a 45 y 51 a 64 semanas) la distribución de probabilidad no fue similar. Sin embargo, más que un error de medición podría considerarse que estas categorías tienen un rango amplio de edad y comparar su promedio de mortalidad con las observaciones obtenidas de un solo grupo de huevos podría afectar la comparabilidad de las probabilidades. Adicionalmente, los huevos del seguimiento pertenecían a reproductoras de 40 y 64 semanas, por lo que se esperaría que el desempeño fuera menor hacia el final del intervalo de edad y por lo tanto el número de embriones muertos observado fue mayor en el seguimiento de estos grupos, que el esperado a partir del promedio de la proporción de ME de cada categoría de edad.

Además de contemplar el error de medición del desenlace, también fue necesario tener en cuenta limitaciones al momento de medir algunas variables independientes. Por ejemplo, lo ideal hubiera sido poder tener la medición de la temperatura de cada granja el día de la postura de los huevos pero no fue posible, por lo tanto la temperatura de la granja solo pudo medirse a partir del promedio histórico categorizado en granjas con más o menos de 28°C. Con el almacenamiento también hubo inconvenientes, ya que la fecha de postura de los huevos se ingresa cada tercer día mientras que el cargue de las incubadoras si se registra diariamente, por lo cual el dato de almacenamiento no es exacto.

Cuando se tienen acceso a los datos de una empresa de este tipo, se encuentra que existe una gran cantidad de información, pero fusionarla para analizarla en conjunto puede ser una tarea complicada. En este caso, fue necesario revisar minuciosamente cada observación en un formato de Excel para ligar correctamente la información original de las reproductoras y las características de sus respectivos huevos. Hacer algo así con una gran cantidad de información resulta dispendioso y puede estar sujeto a errores cuando se deseen analizar datos recopilados durante un periodo más amplio.

Es necesario ser conscientes de que hay variables independientes que solo dieron un acercamiento a lo que podría ocurrir específicamente en los huevos con embriones muertos. Es el caso de la variable contaminación, que fue medida solamente con el cambio de las estructuras internas del huevo y el olor fétido en huevos con embrión muerto, lo que puede implicar una subestimación de la ocurrencia real de infecciones por bacterias u hongos en todo el lote. Para medir el efecto de la contaminación en sentido estricto, debería cultivarse estructuras del embrión o del huevo, al inicio del seguimiento para luego determinar la incidencia de muerte en expuestos y no expuestos. Sin embargo, esto no se realizó de esa manera a causa de factores operativos y prácticos. Por esta razón, la variable proxy que se usó para explorar la asociación se creó a partir de los cambios físicos macroscópicos detectados en embriones muertos y se dicotomizó en el punto de corte sugerido por la guía de manejo. Algo similar ocurrió con la variable de malposición y malformación, que solo se evaluó en aquellos embriones que no pudieron eclosionar.

El muestreo para obtener la incidencia de mortalidad de los grupos en la prueba de campo se realizó como un muestreo por conglomerados para trabajar sobre las bandejas completas y no sobre los huevos distribuidos aleatoriamente en todas las bandejas (lo que garantizaría mayor representatividad). Esto se decidió debido al riesgo que implica manipular todas las bandejas, ya que es posible que las cáscaras se fracturen y esto tenga consecuencias fatales en los embriones. Además, a las dificultades operativas que se puedan generar, ya que hay que tener en cuenta que la empresa tiene un flujo importante de huevos para incubar y no se debe entorpecer las actividades diarias. Sin embargo, la representatividad se garantizó de varias maneras. Primero, hay que tener en cuenta los huevos se producen bajo procesos estándares que buscan maximizar la homogeneidad de los mismos dentro de su respectivo grupo. Como segunda medida, se calculó una muestra con una precisión del 3% para el intervalo de confianza y finalmente se ajustó con un efecto de diseño de 2, para obtener el mayor tamaño de muestra que asegure la representatividad.

En cuanto a factores asociados a la mortalidad, se debe tener en cuenta que como los procesos y la organización de la empresa están estandarizados, existen variables que podrían ser de interés, pero que no pudieron ser evaluadas porque dentro de las condiciones de manejo de la empresa, no existe variabilidad en los procesos. Por ejemplo, se ha reportado que la mortalidad depende de la frecuencia y ángulo de volteo³⁰¹ o de la etapa de la incubadora³⁰², pero no es posible evaluar estas características, porque en la empresa solo hay un tipo de incubadora. Esta situación hace que se limite la generalización de los resultados a poblaciones de huevos producidos en condiciones similares a las de la empresa del estudio. Sin embargo, esto también representa una ventaja, ya que existe un efecto de ajuste por pareamiento de posibles variables de confusión.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que existe un posible sesgo de confusión, pues existen algunas variables que podrían ser confusoras, y que definitivamente no se pudieron medir ni aproximarse con una variable proxy, como es el caso del estadio de desarrollo embrionario al momento de la puesta. Además, dado el gran número de factores relacionados con la ME en diferentes puntos del proceso, en granja y en incubadora, es muy difícil garantizar que se incluyeron todas las posibles variables que impactan el resultado o interactúan entre sí en la práctica diaria.

³⁰¹ ELIBOL O, BRAKE J. Op. Cit.

³⁰² MAEKAWA M. D, REYNA S. P, ALBA C. M, GONZALES G. E. Comparación del Sistema de Incubación de Etapa Única vs Etapa Múltiple sobre los Parámetros Productivos de Huevos de Reproductoras de Carne de Tres Edades. Rev Investig Vet del Perú. 2014;25(4):494–503.

14. CONCLUSIONES

Este estudio representa una forma diferente de abordar el problema de mortalidad embrionaria partiendo de información real de una empresa y abarcando simultáneamente múltiples factores que influyen en la producción de huevo e incubación del mismo, en el objetivo final de obtener un pollo de buena calidad para su levante y engorde.

Contar con una gran cantidad de observaciones (n=819) proporcionó poder suficiente para establecer asociaciones, tanto para la mortalidad total, como para la mortalidad por etapas (temprana, intermedia y tardía), lo cual es una fortaleza, ya que como se soportó en el marco teórico, los factores asociados a cada una de estas etapas son diferentes o impactan la mortalidad en magnitud diferente.

Fue evidente la influencia de aspectos de manejo del huevo como el número de días de almacenamiento, el transporte de la granja a la incubadora, la tecnología de los sistemas de incubación o el método de desinfección en la ME. También, características inherentes a los grupos de huevos como el porcentaje de infertilidad, malposición, malformación, contaminación y huevos fisurados alteran el desarrollo del embrión durante los 21 días de incubación. Además, es necesario aceptar la influencia de las reproductoras en el resultado final, ya que definitivamente características como la edad o la estirpe siempre determinarán la ME directamente o a través de su impacto en aspectos como la calidad de la cáscara o del contenido interno del huevo.

Los hallazgos de este estudio a pesar de tener un enfoque de observación en campo, en general, coincidieron con lo reportado en la literatura en múltiples estudios experimentales, sobre los cuales se basan las recomendaciones especificadas en las guías de manejo. Sin embargo, la ventaja de un estudio de este tipo es que se incluyen condiciones de manejo específicas de la empresa, que pueden mejorarse paulatinamente.

El aspecto que definitivamente estuvo implicado en la ME fue la planta de incubación. Proponer cambiar las máquinas y reestructurar el sitio podría ser una propuesta ilógica teniendo en cuenta las implicaciones económicas que conlleva. Sin embargo, sí es inevitable reconocer que una parte de la ME puede relacionarse con las condiciones adversas inherentes a instalaciones y maquinaria antiguas. Precisamente, reconocer esta debilidad ha permitido que se cuente en la actualidad con las dos incubadoras nuevas que se adaptan a las exigencias de la industria y hacen más eficiente la producción de pollo de un día y obliga a contemplar a futuro el cambio paulatino de las instalaciones antiguas.

Teniendo en cuenta que la contaminación de los huevos también es otro factor muy importante en todas las etapas de mortalidad, se requiere un manejo desde varias perspectivas. Por una parte, el manejo de las reproductoras y del huevo desde la postura hasta su desinfección es muy importante, sin embargo, estos aspectos son estándar para todas las granjas de la empresa por lo cual su impacto no es cuantificable en este estudio. Al contrario, se pudo observar que la técnica de desinfección sí estuvo relacionada con el incremento de la mortalidad pero, aunque solo fue en MEI, podría indicar que es posible seleccionar entre diferentes métodos, de tal manera que se cumpla la finalidad de eliminar la mayoría de los microorganismos de una forma segura, que no altere la funcionalidad de las estructuras que protegen al embrión. Ante esto, se justificaría continuar implementando las cabinas de desinfección que permiten usar métodos de desinfección seca, y reducir al máximo la cantidad de huevos que deben mojarse con métodos de desinfección húmeda.

Por otra parte, este estudio permitió comparar el transporte usado para trasladar los huevos a la incubadora. Aunque el resultado fue inesperado, esto obliga a establecer pautas para maximizar la eficiencia del ambiente controlado y estar alerta frente a un manejo descuidado del sistema.

Respecto al tema del almacenamiento de los huevos, es evidente que superar los 7 días reduce significativamente la viabilidad del embrión. Esto siempre ha estado claro, pero en ocasiones es inevitable teniendo en cuenta que la demanda de pollo puede variar a lo largo del año, y obliga a almacenar los huevos más de lo deseado. Sin embargo, las medidas que se podrían implementar podrían dirigirse a evitar que los huevos de gallinas que superan la mitad del periodo de producción sean almacenados por más de este tiempo, ya que son estos los más susceptibles a ME después de un periodo largo de almacenamiento, comparados con los huevos de reproductoras más jóvenes.

Existen otros factores sobre los cuales definitivamente no se puede incidir, como lo son la genética y la edad de las gallinas, que indirectamente están relacionados con problemas de fertilidad, malformaciones, malposiciones y ME. Sin embargo, tener en cuenta esto, permite que se puedan tomar medidas alternas que por lo menos no empeoren la situación, como lo es controlar lo mejor posible las condiciones ambientales durante todo el proceso.

En la práctica de la avicultura las decisiones se toman con la intención de impactar el grupo de huevos, más que al individuo en sí mismo y este enfoque facilitó que las conclusiones se mantuvieran a este nivel de inferencia. Esto se apoya en lo dicho por Rose y Buck en 1985, quienes indican que cuando se intervienen los factores determinantes de una condición, basados en individuos o en poblaciones, el impacto relacionado con la prevención es diferente. Por una parte, cuando el interés es el individuo, se identifican aquellos susceptibles de alto riesgo para ofrecerles protección individual. En contraste, cuando el interés es poblacional, se busca el control de los determinantes de incidencia en la población como un todo³⁰³. Esto último fue lo que se pretendió con la realización de este estudio y con su análisis completamente ecológico.

³⁰³ ROSE G, BUCK C. Individuos enfermos y poblaciones enfermas. Bol Epidemiológico. 1985;6(3):1-8.

El estudio ecológico se caracteriza porque las unidades de análisis son grupos de personas o animales, más que individuos³⁰⁴. Fue importante tener esto en cuenta, ya que existe una potencial incongruencia entre las asociaciones grupales e individuales que puedan surgir de cada tipo de diseño³⁰⁵, debido a que los factores que determinan la incidencia de un evento en la población, no son necesariamente los mismos que causan el evento en el individuo³⁰⁶. Por consiguiente, fue necesario tener presente esto al momento de la discusión sobre la capacidad inferencial del estudio, para evitar cometer el principal sesgo relacionado con el diseño: la falacia ecológica.

Este tipo de error se comete cuando se hacen inferencias sobre los individuos a partir de análisis de datos de nivel grupal³⁰⁷ y existen tres criterios que deben cumplirse para que exista una falacia ecológica. El primero, hace referencia a la obtención de resultados a partir de un análisis de datos ecológicos; el segundo, requiere que se haga una inferencia hacia los individuos a partir de estos datos; y por último, que existan estudios basados en datos individuales que contradigan los basados en datos ecológicos³⁰⁸. En el presente estudio queda claro que por la naturaleza del diseño se cumplió la primera condición, sin embargo, no se realizaron inferencias hacia el individuo, en este caso el huevo, sino que se mantuvieron a nivel del grupo de huevos proveniente del galpón.

Respecto a esto, es importante aclarar que debido a la falta de literatura similar a este estudio, todas las comparaciones fueron hechas con estudios experimentales en los que la unidad de análisis es el huevo. Aún así, los hallazgos individuales fueron concordantes con los hallazgos a nivel ecológico.

³⁰⁴ BHOPAL RS. Concepts of epidemiology: an integrated introduction to the ideas, theories, principles and methods of epidemiology. Vol. 38. Oxford University Press; 2002.

³⁰⁵ DUFAULT B, KLAR N. The quality of modern cross-sectional ecologic studies: a bibliometric review. *Am J Epidemiol.* 2011;174(10):1101–7.

³⁰⁶ ROSE G, BUCK C. Op. Cit.

³⁰⁷ DIEZ-ROUX A V. Op. Cit.

³⁰⁸ IDROVO AJ. Three Criteria for Ecological Fallacy. *Environ Health Perspect.* 2011;119(8):A332.

Finalmente, se debe destacar el análisis estadístico multinivel utilizado en este documento ya que permitió tener en cuenta la estructura jerárquica de los datos dada por la agrupación de los galpones en lotes y de estos en granjas y la correlación que puede existir entre las observaciones dentro de cada nivel; como consecuencia, se obtuvieron estimadores con menor varianza, más robustos que los obtenidos a partir de modelos más sencillos.

BIBLIOGRAFÍA

A Romanoff AL. Critical periods and causes of death in avian embryonic development. *The auk*. 1949; vol. 66 (3): 264–70.

Alcorn MJ. How to carry out a field investigation. En: Pattison M, McMullin P, Bradbury J, Alexander D., editores. *Poultry diseases*. Sexta edición. Elsevier; 2008. pág 14-38

Almeida J, Vieira S, Reis R, Berres J, Barros R, Ferreira A, et al. Hatching distribution and embryo mortality of eggs laid by broiler breeders of different ages. *Rev Bras Ciência Avícola*. 2008 J;10(2):89–96.

Ar A, Rahn H. Water in the Avian Egg Overall Budget of Incubation. *American zoologist*. 1980;20(2):373–84.

Bahr JM, Palmer SS. The influence of aging on ovarian function. *Crit Rev Poult Biol*. 1989;2(2):103–10.

Bakst MR, Akuffo V. Impact of egg storage on embryo development. *Avian and Poultry Biology Reviews*. 2002; 13(3), 125-131.

Barnett DM, Kumpula BL, Petryk RL, Robinson NA, Renema RA, Robinson FE. Hatchability and Early Chick Growth Potential of Broiler Breeder Eggs with Hairline Cracks. *J Appl Poult Res*. 2004;13(1):65–70.

Beaumont C, Millet N, Le Bihan-Duval E, Kipi A, Dupuy V. Genetic parameters of survival to the different stages of embryonic death in laying hens. *Poult Sci*. 1997;76(9):1193–6.

Bedrani L, Helloin E, Guyot N, Réhault-Godbert S, Nys Y. Passive maternal exposure to environmental microbes selectively modulates the innate defences of chicken egg white by increasing some of its antibacterial activities. *BMC Microbiol.* 2013;13:128.

Benton CE, Brake J. The effect of broiler breeder flock age and length of egg storage on egg albumen during early incubation. *Poult Sci.* 1996;75(9):1069–75.

Bernier PE, Taylor LW, Gunns CA. The relative effects of inbreeding and outbreeding on reproduction in the domestic fowl. Tesis doctoral [Internet]. *Hilgardia* 20(21). 1951 [citado 2015 Apr 5]. p. 529–628. Disponible en: <http://hilgardia.ucanr.edu/Abstract/?a=hilg.v20n21p529>

Bhopal RS. Concepts of epidemiology: an integrated introduction to the ideas, theories, principles and methods of epidemiology. Vol. 38. Oxford University Press; 2002.

Blanco-Becerra LC, Pinzón-Flórez CE, Idrovo ÁJ. Estudios ecológicos en salud ambiental: más allá de la epidemiología. *Biomédica.* 2015;35:191.

Bloom SE, Muscarella DE, Lee MY, Rachlinski M. Cell death in the avian blastoderm: resistance to stress-induced apoptosis and expression of anti-apoptotic genes. *Cell Death and Differ.* 1998;5(6):529–38.

Bloom SE. Chromosome abnormalities in chicken (*Gallus domesticus*) embryos: Types, frequencies and phenotypic effects. *Chromosoma.* 1972;37(3):309–26.

Borja-Aburto, V. H.. Estudios ecológicos. *Salud Pública de México,* 2000;42(6): 533-538.

Brake J, Sheldon BW. Effect of a Quaternary Ammonium Sanitizer for Hatching Eggs on Their Contamination, Permeability, Water Loss, and Hatchability. *Poult Sci.* 1990;69(4):517–25.

Brake J, Walsh TJ, Benton CE, Petite JN, Meijerhof R, Penalva G. Egg handling and storage. *Poult Sci.* 1997;76(1):144–51.

Bramwell RK, Marks HL, Howarth B. Quantitative Determination of Spermatozoa Penetration of the Perivitelline Layer of the Hen's Ovum as Assessed on Oviposited Eggs. *Poult Sci.* 1995;74(11):1875–83.

Brillard JP, McDaniel GR. Influence of Spermatozoa Numbers and Insemination Frequency on Fertility in Dwarf Broiler Breeder Hens. *Poult Sci.* 1986;65(12):2330–4.

Bruce J, Johnson AL. The bacterial flora of unhatched eggs. *Br Poult Sci.* 2007;19(5):681–9.

Bruzual JJ, Peak SD, Brake J, Peebles ED. Effects of Relative Humidity During Incubation on Hatchability and Body Weight of Broiler Chicks from Young Breeder Flocks. *Poult Sci.* 2000;79(6):827–30.

Byerly TC, Olsen MW. Causes of the Embryonic Malposition Head-Under-Left-Wing. *Poult Sci.* 1934;13(5):278–82.

Byerly TC, Olsen MW. Time and Manner of Determination of the Malposition Head in small end of egg. *Poult Sci.* 1933;12(4):261–5.

Cadirci S. Desinfection of hatching eggs by formaldehyde fumigation - A review. *Arch fur Geflugelkd.* 2009;73(2):116–23.

Charles Lincoln E. The Physiological Zero and the Index of Development for the Egg of the Domestic Fowl, *Gallus domesticus*. *Science New Series*. 1902; 15(379):521–2.

Christensen V. Factors associated with early embryonic mortality. *Worlds Poult Sci J*. 2001;57(04):359-372.

Christensen VL, Wineland MJ, Fassenko GM, Donaldson WE. Egg Storage Effects on Plasma Glucose and Supply and Demand Tissue Glycogen Concentrations of Broiler Embryos. *Poult Sci*. 2001;80(12):1729–35.

Cilievisi O, Cordos I, Ghiduş E, Moldovan A. The toxic and teratogenic effect of aflatoxin B1 on the chick embryo development. *Morphol Embryol (Bucur)*. 1980;26(4):309–14.

Cobb vantress. Guia de manejo de la incubadora [internet]. 2013 [citado 2015 abril 6]. Disponible en: <http://www.cobb-vantress.com/docs/default-source/guides/cobb-hatchery-management-guide---spanish.pdf?sfvrsn=2>

Complemento para el manejo de reproductoras Ross 308 [Internet]. 2011 [citado 2015 Aug 9]. Disponible en: <http://cobb-vantress.com/docs/default-source/cobb-500-guides/sf-breeder-management-supplement---Spanish.pdf>

Cook MI, Beissinger SR, Toranzos G, Arendt WJ. Effects of incubation on avian eggshell microbial processes: implications for maintaining egg viability prior to clutch completion. *Ecol Lett*. 2005;8:532–7.

Cook MI, Beissinger SR, Toranzos GA, Arendt WJ. Incubation reduces microbial growth on eggshells and the opportunity for trans-shell infection. *Ecol Lett*. 2005;8(5):532–7.

Cruickshank EM. Studies in fat metabolism in the fowl: The composition of the egg fat and depot fat of the fowl as affected by the ingestion of large amounts of different fats. *Biochem J.* 1934;28(3):965–77.

Davis TA, Ackerman RA. Effects of increased water loss on growth and water content of the chick embryo. *J Exp Zool Suppl.* 1987;1:357–64.

Davis TA, Shen SS, Ackerman RA. Embryonic osmoregulation: Consequences of high and low water loss during incubation of the chicken egg. *J Exp Zool.* 1988;245(2):144-56.

De Reu K, Grijspeerdt K, Heyndrickx M, Zoons J, De Baere K, Uyttendaele M, et al. Bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and aviary housing systems for laying hens. *Br poult sci.* 2005;46(2):149–55.

De Reu K, Grijspeerdt K, Messens W, Heyndrickx M, Uyttendaele M, Debevere J, et al. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. *Int J Food Microbiol.* 2006; 112(3):253–60.

De Reu K, Rodenburg TB, Grijspeerdt K, Messens W, Heyndrickx M, Tuytens FAM, et al. Bacteriological contamination, dirt, and cracks of eggshells in furnished cages and noncage systems for laying hens: an international on-farm comparison. *Poult Sci.* 2009;88(11):2442–8.

Deeming DC, Ferguson MWJ. Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles. Cambridge University Press; 1991.

Deeming DC, van Middelkoop JH. Effect of strain and flock age on fertility and early embryonic mortality of broiler breeder eggs. *Br Poult Sci.* 1999;40 Suppl:S22–3.

Deeming DC. Characteristics of unturned eggs: critical period, retarded embryonic growth and poor albumen utilisation. *Br Poult Sci.* 1989;30(2):239–49.

Diez-Roux A V. Bringing context back into epidemiology: variables and fallacies in multilevel analysis. *Am J Public Health.* 1998;88(2):216–22.

Dufault B, Klar N. The quality of modern cross-sectional ecologic studies: a bibliometric review. *Am J Epidemiol.* 2011;174(10):1101–7.

Dymond J, Vinyard B, Nicholson AD, French NA, Bakst MR. Short periods of incubation during egg storage increase hatchability and chick quality in long-stored broiler eggs. *Poult Sci.* 2013;92(11):2977–87.

Elibol O, Brake J. Effect of egg position during three and fourteen days of storage and turning frequency during subsequent incubation on hatchability of broiler hatching eggs. *Poult Sci.* 2008;87(6):1237–41.

Elibol O, Brake J. Effect of Egg Turning Angle and Frequency During Incubation on Hatchability and Incidence of Unhatched Broiler Embryos with Head in the Small End of the Egg. *Poult Sci.* 2006;85(8):1433–7.

Elibol O, Brake J. Effect of egg weight and position relative to incubator fan on broiler hatchability and chick quality. *Poult Sci.* 2008;87(9):1913–8.

Elibol O, Brake J. Effect of Flock Age, Cessation of Egg Turning, and Turning Frequency Through the Second Week of Incubation on Hatchability of Broiler Hatching Eggs. *Poult Sci.* 2006;85(8):1498–501.

Elibol O, Brake J. Identification of critical periods for turning broiler hatching eggs during incubation. *Br Poult Sci.* 2004;45(5):631–7.

Elibol O, Braket J. Effect of frequency of turning from three to eleven days of incubation on hatchability of broiler hatching eggs. *Poult Sci.* 2003;82(3):357–9.

Fasenko GM, Hardin RT, Robinson FE, Wilson JL. Relationship of Hen Age and Egg Sequence Position with Fertility, Hatchability, Viability, and Preincubation Embryonic Development in Broiler Breeders. *Poult Sci.* 1992;71(8):1374–83.

Fasenko GM, Robinson FE, Whelan AI, Kremeniuk KM, Walker JA. Prestorage Incubation of Long-Term Stored Broiler Breeder Eggs: 1. Effects on Hatchability. *Poult Sci.* 2001;80(10):1406–11.

Fasenko GM, Wilson JL, Robinson FE, Hardin RT. Effects of length of egg nest holding time and high environmental temperatures on prestorage embryonic development, survival, and hatchability of broiler breeders. *J appl poult res.* 1999;8(4):488–92.

Fasenko GM. Egg storage and the embryo. *Poult Sci.* 2007;86(5):1020–4.

FENAVI. Avicultura: 2014 con buena calificación. *Rev avic [internet].* 2015 [citado 2015 ago 19]; 223:18–37. Disponible en: <http://www.fenavi.org/images/stories/revistaavicultores/pdfs/revista-223.pdf>

FENAVI. Avicultura: la industria que alimenta a colombia. *Rev avic [internet].* 2015 [citado 2015 ago 18];225:42–3. Disponible en: <http://www.fenavi.org/images/stories/revistaavicultores/libros/revista-225>

FENAVI. Estadísticas Consumo Per Cápita [Internet]. [cited 2016 Feb 15]. Available from: http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2160&Itemid=556

FENAVI. Estadísticas Producción público [Internet]. [citado 2016 Feb 15]. Disponible en: http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2472&Itemid=1330

French NA. Modeling incubation temperature: the effects of incubator design, embryonic development, and egg size. *Poult Sci.* 1997;76(1):124–33.

Funk EM, Biellier H V. The Minimum Temperature for Embryonic Development in the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *Poult Sci.* 1944 3(6):538–40.

Funk EM. Relation of Time of Laying to Hatchability. *Poult Sci.* 1934;13(3):184–7.

Furuta K, Maruyama S. Bacterial contamination on eggs during incubation and hatching, and of fluffs of newly-hatched chicks. *Br Poult Sci.* 2008;22(3):247–54.

Galvis LA. La demanda de carnes en colombia: un análisis econométrico. Documentos de trabajo sobre economía regional [Internet]. 2000 [citado 2015 ago 15]; No. 13. Disponible en: <http://www.banrep.gov.co/sites/default/files/publicaciones/archivos/DTSER13-Carnes.pdf>

Gildersleeve RP, Boeschen DP. The effects of incubator carbon dioxide level on turkey hatchability. *Poult Sci.* 1983;62(5):779–84.

Gowe RS. Techniques for Identifying Fertile Hens' Eggs. *Poult Sci.* 1950;29(3):409–13.

Graves JS, Dunn BE, Brown SC. Embryonic chick allantois: functional isolation and development of sodium transport. *Am J Physiol.* 1986;251(5 Pt 1):C787–94.

Grizard S, Dini-Andreote F, Tieleman BI, Salles JF. Dynamics of bacterial and fungal communities associated with eggshells during incubation. *Ecol Evol.* 2014;4(7):1140–57.

Gualhanone A, Furlan R, Fernandez-Alarcon M, Macari M. Effect of breeder age on eggshell thickness, surface temperature, hatchability and chick weigh. *Rev Bras Ciência Avícola.* 2012;14(1):09–14.

Guío M, Briñez J, Amado J, Martínez A. Efecto del almacenamiento de huevo incubable con la cámara de aire hacia abajo, sobre la incubabilidad, según la edad de las reproductoras, para tres días de rotación. *Revista Ciencia Animal.* 2011;(4): 89–96.

Halbersleben DL, Mussehl FE. Relation of Egg Weight to Chick Weight at Hatching. *Poult Sci.* 1922;1(4):143–4.

Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol.* 1951;88(1):49–92.

Hays FA, Nicolaidis C. Variability in Development of Fresh-Laid Hen Eggs. *Poult Sci.* 1934;13(2):74–80.

Hrnčár C, Prachárová S, Bujko J. The Effect of Disinfection of Hatching Eggs on Hatchability of Oravka Chickens. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies.* 2012;45(2):411–4.

Hurnik GI, Reinhart BS, Hurnik JF. Relationship between albumen quality and hatchability in fresh and stored hatching eggs. *Poult Sci.* 1978;57(4):854–7.

Hutt FB, Cavers JR. The lethal nature of certain malpositions of the chick embryo. Poul Sci. 1931;10:403–4.

Hutt FB, Pilkey AM. Studies in Embryonic Mortality in the Fowl, V. Relationships Between Positions of the Egg and Frequencies of Malpositions. Poul Sci. 1934;13(1):3–13.

Hutt FB, pilkey AM. Studies in Embryonic Mortality in the Fowl: IV: Comparative Mortality Rates in Eggs Laid at Different Periods of the Day and their Bearing on Theories of the Origin of Monsters. Poul Sci. 1930;9(3):194–203.

Hutt FB. Embryonic Mortality in the Fowl: VII. On the Relation of Malpositions to the Size and Shape of Eggs. Poul Sci. 1938;17(4):345–52.

Hutt FB. X. Studies in Embryonic Mortality in the Fowl. I. The Frequencies of Various Malpositions of the Chick Embryo and their Significance. Proc R Soc Edinburgh. 1930;49:118–30.

Idrovo AJ. Three Criteria for Ecological Fallacy. Environ Health Perspect. 2011;119(8):A332.

Jahantigh M, Rashki A, Najimi M. A study on bacterial flora and antibacterial resistance of yolk sac infection in Japanese quail (*Coturnix japonica*). Comp Clin Path. 2013;22(4):645–8.

Jassim EW, Grossman M, Koops WJ, Luykx RAJ. Multiphasic analysis of embryonic mortality in chickens. Poul Sci. 1996;75(4):464–71.

Khan MJA, Khan SH, Bukhsh A, Abbass MI, Javed M. Effect of different storage period on egg weight, internal egg quality and hatchability characteristics of Fayumi eggs. Ital J Anim Sci. 2013;12(2):51.

Kinnucan HW. Effects of health information and generic advertising on U.S. meat demand. *Am j agric econ.* 1997; 79(1):13–23.

Kosin IL. Macro- and Microscopic Methods of Detecting Fertility in Unincubated Hen's Eggs. *Poult Sci.* 1944;23(4):266–9.

Kučera P, Raddatz E. Spatio-temporal micromeasurements of the oxygen uptake in the developing chick embryo. *Respir Physiol.* 1980;39(2):199–215.

Kuo ZY. Ontogeny of embryonic behavior in aves. II. The mechanical factors in the various stages leading to hatching. *J Exp Zool.* 1932;62(2):453–87.

Kuurman W, Bailey B, Koops W, Grossman M. A model for failure of a chicken embryo to survive incubation. *Poult Sci.* 2003;82(2):214–22.

Landauer W. Hatchability of chicken eggs as influenced by environment and heredity. [internet]. Monografía. Storrs agricultural experiment station: Exp Stn Univ Conn. 1967 [citado 2015 ago 10]. Disponible en: <http://digitalcommons.uconn.edu/saes/1>

Lapão C, Gama LT, Soares MC. Effects of broiler breeder age and length of egg storage on albumen characteristics and hatchability. *Poult Sci.* 1999;78(5):640–5.

Liptói K, Hidas A. Investigation of possible genetic background of early embryonic mortality in poultry. *Worlds Poult Sci J.* 2006;62(2):326–37.

Lourens A, Molenaar R, van den Brand H, Heetkamp MJW, Meijerhof R, Kemp B. Effect of Egg Size on Heat Production and the Transition of Energy From Egg to Hatchling. *Poult Sci.* 2006;85(4):770–6.

Lourens A, van den Brand H, Heetkamp MJW, Meijerhof R, Kemp B. Effects of Eggshell Temperature and Oxygen Concentration on Embryo Growth and Metabolism During Incubation. *Poult Sci.* 2007;86(10):2194–9.

Lourens A. Heating eggs before storage. *World Poult.* 2006;22:22–3.

MacPollo. Misión y visión. [Internet]. [Citado 2016 feb 15]. Disponible en: <http://macpollo123.blogspot.com.co/p/mision-y-vision.html>

Maekawa M. D, Reyna S. P, Alba C. M, Gonzales G. E. Comparación del Sistema de Incubación de Etapa Única vs Etapa Múltiple sobre los Parámetros Productivos de Huevos de Reproductoras de Carne de Tres Edades. *Rev Investig Vet del Perú.* 2014;25(4):494–503.

Mather CM, Laughlin KF. Storage of hatching eggs: The effect on total incubation period. *Br Poult Sci.* 2007;17(5):471–9.

Mayes FJ, Takeballi MA. Storage of the Eggs of the Fowl (*Gallus domesticus*) before Incubation: A Review. *Worlds Poult Sci J.* 1984;40(2):131.

McDaniel GR, Roland DA, Coleman MA. The Effect of Egg Shell Quality on Hatchability and Embryonic Mortality. *Poult Sci.* 1979;58(1):10–3.

McKerley RG, Newell GW, Berry JG, Odell G V, Morrison RD. The effects of some acidic and alkaline atmospheres on the changes in pH and Haugh units in chicken eggs. *Poult Sci.* 1967;46(1):118–32.

McNally EH, Byerly TC. Variation in the Development of Embryos of Hens' Eggs. *Poult Sci.* 1936;15(4):280–3.

Meijerhof R, van Beek G. Mathematical Modelling of Temperature and Moisture Loss of Hatching Eggs. *J Theor Biol.* 1993;165(1):27–41.

Meijerhof R. Theoretical and empirical studies on temperature and moisture loss of hatching eggs during the preincubation period [Internet]. PhD thesis. 1994 [citado 2015 Jul 27]. Disponible en: <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/599194>

Menge H, Calvert CC, Denton CA. Further studies of the effect of linoleic acid on reproduction in the hen. *J Nutr. Am Soc Nutrition*; 1965;86(2):115–9.

Molenaar R, Meijerhof R, van den Anker I, Heetkamp MJW, van den Borne JJGC, Kemp B, et al. Effect of eggshell temperature and oxygen concentration on survival rate and nutrient utilization in chicken embryos. *Poult Sci.* 2010;89(9):2010–21.

Morgenstern H. Ecologic studies in epidemiology: concepts, principles, and methods. *Annu Rev Public Health.* 1995;16:61–81.

Mortola JP. Gas exchange in avian embryos and hatchlings. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2009;153(4):359–77.

Mueller CA, Burggren WW, Tazawa H. The physiology of the avian embryo. *Sturkie's Avian Physiology* [Internet]. Sexta edición. Elsevier; 2015 [citado 2015 Apr 3]. pág 739-766. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124071605000324>

New DAT. A Critical Period for the Turning of Hens' Eggs. *J Embryol Exp Morphol.* 1957;5(3):293–9.

Nicolaidis C. Relation of time of laying and embryonic mortality. *Poult sci.* 1933; 12(4):274–6.

Noiva RM, Menezes AC, Peleteiro MC. Influence of temperature and humidity manipulation on chicken embryonic development. *Bmc vet res.* 2014;10(1):1–21.

North MO, Bell DD. Commercial chicken production manual. Cuarta edición. New York: Springer; 1990.

Operadora avícola: consolidación del mercado colombiano de pollo. Rev ind avíc. [Internet]. 2015 [Citado 2016 feb 15]; 62(10):10. Disponible en: <http://www.industriaavicola-digital.com/201510#&pageSet=6>

Oppenheim RW. Prehatching and hatching behaviour in birds: A comparative study of altricial and precocial species. Anim Behav. 1972;20(4):644–55.

Patten BM. The Early Embryology of the Chick. Philadelphia: Hijo de P. Blakiston y Co. 1920.

Payne LF. Distribution of Mortality During the Period of Incubation. Poult Sci. 1919;s2-6(2):9–12.

Peebles ED, Brake J. Eggshell Quality and Hatchability in Broiler Breeder Eggs,. Poult Sci. 1987;66(4):596–604.

Peebles ED, Brake J. Relationship of Eggshell Porosity to Stage of Embryonic Development in Broiler Breeders. Poult Sci. 1985;64(12):2388–91.

Peebles ED, Pansky T, Doyle SM, Boyle CR, Smith TW, Latour MA, et al. Effects of dietary fat and eggshell cuticle removal on egg water loss and embryo growth in broiler hatching eggs. Poult Sci. 1998;77(10):1522–30.

Peebles ED, Zumwalt CD, Doyle SM, Gerard PD, Latour MA, Boyle CR, et al. Effects of dietary fat type and level on broiler breeder performance. Poult Sci. 2000;79(5):629–39.

Pérez-Arévalo ML, Ascanio E, Soto Bracho J, Román R, Arrieta D, Rincón H. Mortalidad Embrionaria en Pollitos Causada por Aflatoxina B1 Transmitida Vía Transovárica. *Rev Científica*. 2007;17(3):275–9.

Phoudfoot FG. Advance note on the hatchability of chicken eggs stored small end up. *Can J Anim Sci*. 1967;47(2):142–3.

Proudfoot FG, Hamilton RMG. Care of hatching eggs before incubation. *Agriculture Canada*; 1990; pág 1-18.

Proudfoot FG. Effect of packing orientation, daily positional change and vibration on the hatchability of chicken eggs stored up to four weeks. *Can J Anim Sci*. 1969;49(1):29–35.

Reid WM, Maag TA, Boyd FM, Kleckner AL, Schmittle SC. Embryo and Baby Chick Mortality and Morbidity Induced by a Strain of *Escherichia Coli*. *Poult Sci*. 1961;40(6):1497–502.

Reijrink IA, Meijerhof R, Kemp B, Van Den Brand H. The chicken embryo and its micro environment during egg storage and early incubation. *Worlds Poult Sci J*. 2008; 64(4):581–98.

Reijrink IAM, Meijerhof R, Kemp B, Graat EAM, van den Brand H. Influence of prestorage incubation on embryonic development, hatchability, and chick quality. *Poult Sci*. 2009;88(12):2649–60.

Reis LH, Gama LT, Soares MC. Effects of short storage conditions and broiler breeder age on hatchability, hatching time, and chick weights. *Poult Sci*. 1997;76(11):1459–66.

Reproductoras Ross 308. Objetivos de rendimiento [Internet]. 2013 [citado 2015 Ago 9]. Disponible en: http://avicol.co/descargas2/Ross-308-Reproductoras-Objetivos-de-Rendimiento-2011_SP.pdf

Ricklefs RE, Hahn DC, Montevecchi WA. The Relationship between Egg Size and Chick Size in the Laughing Gull and Japanese Quail. *The Auk*. 1978;95(1):135–44.
Roberts JR, Chousalkar KK. Effect of production system and flock age on egg quality and total bacterial load in commercial laying hens. *J Appl Poult Res*. 2014;23(1):59–70.

Robertson IS. Studies on the effect of humidity on the hatchability of hen's eggs I. The determination of optimum humidity for incubation. *J Agric Sci*. 2009;57(02):185.

Robertson IS. The influence of turning on the hatchability of hens' eggs II. The effect of turning frequency on the pattern of mortality, the incidence of malpositions, malformations and dead embryos with no somatic abnormality. *J Agric Sci*. 1961;57(01):57–69

Robinson FE, Hardin RT, Robinson NA, Williams BJ. The Influence of Egg Sequence Position on Fertility, Embryo Viability, and Embryo Weight in Broiler Breeders. *Poult Sci*. 1991;70(4):760–5.

Robinson; F.E. Management for control of ovarian development in broiler breeders. *The poultry informed professional*. 2002; 59: 1–7.

Roland DA. Factors Influencing Shell Quality of Aging Hens. *Poult Sci*. 1979;58(4):774–7.

Romanoff AL, Romanoff AJ. Pathogenesis of the avian embryo: an analysis of causes of malformations and prenatal death. *Teratology*. 1972; 8(1): 81-82.

Romanoff AL, Romanoff AJ. The avian egg. New York : John Wiley & Sons; 1949.

Romanoff AL. The avian embryo. Structural and functional development. New York and London: The Macmillan Co., New York; 1960.

Rose G, Buck C. Individuos enfermos y poblaciones enfermas. Bol Epidemiológico. 1985;6(3):1–8.

Rose ME, Orlans E, Buttress N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. Eur J Immunol. 1974;4(7):521–3.

Sanctuary WC. One Cause of Dead Chicks in the Shell. Poult Sci. 1925;4(4):141–3.

Savage TF, DeFrank MP, Brean SE. Blood ring: an early embryonic lethal condition in chickens. J Hered. 1988;79(2):124–8.

Savage TF, Mirosh LW, Jones JL, Schneiderman ET. Blastoderm Degeneration, an Early Embryonic Failure in Dwarf Single Comb White Leghorn Chickens. J Hered. 1992;83(4):249–54.

Schäfer A, Drewes W, Schwägele F. Effect of storage temperature and time on egg white protein. Food/Nahrung. 1999;43(2):86–9.

Scott TA, Mackenzie CJ. Incidence and classification of early embryonic mortality in broiler breeder chickens. Br Poult Sci. 1993;34(3):459–70.

Scott TA, Silversides FG. The effect of storage and strain of hen on egg quality. Poult Sci. 2000;79(12):1725–9.

Sewalem A, Wilhelmson M. Genetic study of embryonic mortality in White Leghorn lines selected for egg production traits. *Br Poult Sci.* 1999;40(4):467–71.

Shawkey MD, Kosciuch KL, Liu M, Rohwer FC, Loos ER, Wang JM, et al. Do birds differentially distribute antimicrobial proteins within clutches of eggs? *Behav Ecol.* 2008;19(4):920–7.

Smith JB. Malpositions: a factor in hatchability. *Proc 22nd Ann Meet Poul Sci Assoc.* 1930;66–71.

Stenhouse S. The poultry industry. En: Pattison M, McMullin P, Bradbury J, Alexander D, editores. *Poultry diseases*. Sexta edición. Elsevier; 2008. pág 2-13.

Stern CD, Tullett SG. The sub-embryonic fluid of the egg of the domestic fowl and its relationship to the early development of the embryo. *Avian incubation.* 1990. pág. 81–90.

Swann GS, Brake J. Effect of dry-bulb temperature, relative humidity, and eggshell conductance during the first three days of incubation on egg weight loss and chick weight. *Poult sci.* 1990;69(4):535–44.

Taylor LW, Kreuziger GO. The Gaseous Environment of the Chick Embryo in Relation to Its Development and Hatchability: 2. Effect of Carbon Dioxide and Oxygen Levels During the Period of the Fifth through the Eighth Days of Incubation. *Poult Sci.* 1965;44(1):98–106.

Taylor LW, Sjodin RA, Gunns CA. The Gaseous Environment of the Chick Embryo in Relation to Its Development and Hatchability: 1. Effect of Carbon Dioxide and Oxygen Levels during the First Four Days of Incubation upon Hatchability. *Poult Sci.* 1956;35(6):1206–15.

Thorne MH, Collins RK, Sheldon BL. Chromosome analysis of early embryonic mortality in layer and broiler chickens. *Br Poult Sci.* 1991;32(4):711–22.

Tona K, Bamelis F, De Ketelaere B, Bruggeman V, Moraes V, Buyse J, et al. Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth. *Poult Sci.* 2003;82(5):736–41.

Tona K, Onagbesan O, De Ketelaere B, Decuypere E, Bruggeman V. Effects of turning duration during incubation on corticosterone and thyroid hormone levels, gas pressures in air cell, chick quality, and juvenile growth. *Poult Sci.* 2003;82(12):1974–9.

Tullett S. Como investigar las prácticas de incubación [Internet]. *Ross Tech.* 2009 [citado 2015 Ago 3]. Disponible en: <http://www.avicol.co/descargas2/RossTechInvpracticass.pdf>

Ulmer-Franco AM, Fasenko GM, O'Dea Christopher EE. Hatching egg characteristics, chick quality, and broiler performance at 2 breeder flock ages and from 3 egg weights. *Poult Sci.* 2010;89(12):2735–42.

Van de Ven LJJF, Baller L, van Wagenberg AV, Kemp B, van den Brand H. Effects of egg position during late incubation on hatching parameters and chick quality. *Poult Sci.* 2011;90(10):2342–7.

Van Der Pol CW, Van Rovert-Reijrink IA, Maatjens CM, Van Den Brand H, Molenaar R. Effect of relative humidity during incubation at a set eggshell temperature and brooding temperature posthatch on embryonic mortality and chick quality. *Poult sci.* 2013;92(8):2145–55.

Van Dijk A, Veldhuizen EJA, Haagsman HP. Avian defensins. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008;124(1):1–18.

Walsh TJ, Rizk RE, Brake J. Effects of Temperature and Carbon Dioxide on Albumen Characteristics, Weight Loss, and Early Embryonic Mortality of Long Stored Hatching Eggs. *Poult Sci.* 1995;74(9):1403–10.

Warren DC, Scott HM. The Time Factor in Egg Formation. *Poult Sci.* 1935;14(4):195–207.

Warren, D.C. and Scott HM. Physiological factors influencing the rate of egg formation in the domestic hen. *Journal of Agricultural Research.* 1935;51: 565–72.

Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol.* 2000;203(Pt 8):1253–63.

Wilson HR, Tulett SG. Physiological requirements of the developing embryo: temperature and turning. *Avian incubation.* 1990. pág 145–56.

Wilson HR. Effects of maternal nutrition on hatchability. *Poult Sci.* 1997;76(1):134–43.

Xu LJ, Mortola JP. Effects of hypoxia or hyperoxia on the lung of the chick embryo. *Can J Physiol Pharmacol.* 1989;67(5):515–9.

Yahav S, Brake J. Chick Embryogenesis: A Unique Platform to Study the Effects of Environmental Factors on Embryo Development. *J Stem Cells.* 2014;9(1):17–37.

Yahav S. Regulation of body temperature: Strategies and Mechanisms. *Sturkie's Avian Physiology* [Internet]. Sexta edición. Elsevier; 2015 [citado 2015 Apr 3]. pág 739-766. Disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124071605000373>

Yannakopoulos AL, Tserveni-Gousi AS. Relationship of Parents' Age, Hatching Egg Weight, and Shell Quality to Day-Old Chick Weight as Influenced by Oviposition Time. *Poult Sci.* 1987;66(5):829–33.

Yildirim I, Yetisir R. Effects of different hatcher temperatures on hatching traits of broiler embryos during the last five days of incubation. *S afr j anim sci.* 2004; 34(4):211–6.

ANEXOS

Anexo A: Tabla de operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Clasificación	Escala de medición	Valores que asume
Variable Dependiente					
Mortalidad embrionaria total	Cese global de las funciones sistémicas del embrión	Total de huevos incubados que a la ovoscopía o embriodiagnóstico han detenido su desarrollo embrionario los 21 días de incubación	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero
Mortalidad embrionaria por días	Embriones muertos durante cada uno de los 21 días de incubación	Total de huevos incubados muertos para cada uno de los 21 días de incubación, según los hallazgos en ovoscopía y embriodiagnóstico, según descripción de Hamilton y Hamburger	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero
Variables independientes					
Variables agrupadas					
Contaminación temprana	Infección del huevo por agentes bacterianos o fúngicos que altera el aspecto de las estructuras de huevo y el	Total huevos incubados que sufren cambios en el contenido del huevo compatible con contaminación detectados	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero

	embrión	en la ovoscopia o embriodiagnostico durante los días 1 a 10 de incubación			
Contaminación tardía	Infección del huevo por agentes bacterianos o fúngicos que altera el aspecto de las estructuras de huevo y el embrión	% de huevos incubados que sufren cambios en el contenido del huevo compatible con contaminación detectados en la ovoscopia o embriodiagnostico durante los días 11 a 21 de incubación	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero
Infertilidad	Incapacidad del óvulo y el espermatozoi de para producir un embrión	Total de huevos incubados que a la ovoscopia o embriodiagnostico presentan blastodisco	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero
Malformación total	Anomalía estructural del embrión	Total de huevos incubados con embriones que presentan malformación macroscópica de cualquier parte de la anatomía del embrión	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero
% por tipo de malformación	Clasificación especifica de anomalía observada	% de embriones malformados para cada	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero entre 0 y 100%

		tipo de malformación según órgano afectado: ojos, cráneo, pico, abdomen, extremidades inferiores, superiores o embriones fusionados			
Malposición total	Imposibilidad del embrión de alcanzar la posición normal dentro del huevo, para eclosionar	Total de huevos incubados con presencia de una posición anormal del embrión dentro del huevo, que impide la eclosión	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero
% Tipo de malposición	Clasificación de la malposición	% de embriones mal posicionados para cada tipo de malposición del embrión evidenciada en huevos que no pudieron nacer. Según clasificación I-VI	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero entre 0 y 100%
Huevos picados no nacidos	El embrión pica la cáscara, pero no logra eclosionar	Total de huevos incubados que el día 21 de incubación evidencian picaje de la cáscara, pero el embrión no eclosionó	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero

Total huevos evaluados	Huevos revisados en el embriodiagnóstico	Total de huevos seleccionados para realizar el embriodiagnóstico el día de la eclosión	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero
Total producción de huevo	Huevo total producido en el día por un grupo de reproductoras	Huevos totales recolectados por el personal	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero
Huevo descartado en granja	Clasificación del huevo en la granja según el estado físico de la superficie de la cáscara. Huevo no apto para incubación	Condición de la cáscara al momento de la recolección. Estos huevos son descartados por estar muy sucios, lo que impide su envío a la incubadora por alto riesgo de contaminación	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero
Huevo comercial	Huevo apto para consumo humano	Huevos no aptos para incubación por tamaños extremos (menos de 48g o más de 75g) o anomalías de la cáscara.	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero
Huevo incubable	Huevos aptos para incubación	Huevo de calidad que es enviado a la incubadora	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero
Huevo descartado en incubadora a la llegada de	Clasificación del huevo en la incubadora según el	Total de huevos descartados por estar	Cuantitativa	Razón continua	Cualquier numero

la granja	estado físico de la superficie de la cáscara. Huevo no apto para incubación	sucios o por ruptura durante el transporte			
Peso promedio del huevo fresco	Medida de la fuerza gravitacional que se ejerce sobre el huevo	Se pesa una bandeja de huevos frescos. Se registra el dato y el número de huevos pesados. Se resta el peso de la bandeja vacía, y se divide el total entre el número de huevos pesados.	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número. Unidad en gramos
Peso promedio del huevo al día 18 de incubación	Medida de la fuerza gravitacional que se ejerce sobre el huevo	Se pesa la misma bandeja pesada en fresco, pero ahora al momento de la transferencia. Se resta el peso de la bandeja vacía, y se divide el total entre el número de huevos pesados.	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número. Unidad en gramos
% Pérdida de agua al día 18 de incubación	Pérdida de vapor de agua a través de los poros de la cáscara	$\% = (\text{peso bandeja frescos llena} - \text{peso bandeja transferencia llena}) / (\text{peso bandeja frescos llena} - \text{bandeja})$	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número entre 0 y 100%

		vacía)			
Huevos invertidos	Orientación del huevo durante la incubación con el polo agudo hacia arriba	Total de huevos incubados que quedaron con orientación invertida del polo agudo	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier numero
Huevos fisurados, rotos o con mala calidad de la cáscara	Perdida de continuidad de la cáscara	Total de huevos que presentaron fisuras, ruptura o alguna alteración de la cáscara que afectó negativamente al embrión durante la incubación	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier numero
Razón hembra - macho	Relación entre el numero de hembras y machos que hay en el galpón en la semana que se recolectan los huevos	División entre el número de hembras y los machos que hay en el galpón	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número
Densidad de aves por salón	Aves alojadas por unidad de espacio	Cantidad de aves alojadas por m ² , en los galpones	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número
Peso promedio de la hembra	Medida de la fuerza gravitacional que se ejerce sobre la hembra	Promedio de peso del las gallinas del salón, en la semana en que se seleccionan los huevos	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número. Unidad en gramos
Peso promedio del macho	Medida de la fuerza gravitacional que se ejerce sobre el	Promedio de peso del los gallos del salón, en la semana en	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número. Unidad en gramos

	macho	que se seleccionan los huevos			
Consumo de alimento hembras	Ingesta de alimento por parte de las hembras	Promedio de consumo de alimento de las hembras por salón	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número. Unidad en gramos
Consumo de alimento machos	Ingesta de alimento por parte de los machos	Promedio de consumo de alimento de los machos por salón	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número. Unidad en gramos
% Producción del lote	Porcentaje de producción de huevo	Proporción de huevos producidos en el día respecto al total de gallinas	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número entre 0 y 100%
Variables ambientales					
Edad de la reproductora	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el día de la recolección de los huevos	Tiempo en semanas del lote, el día de la recolección	Cuantitativa	Razón Discreta	Cualquier número de 1 -64
Estirpe	Línea genética de los individuos	Línea genética de las reproductoras según casa comercial donde son adquiridas	Cualitativa	Nominal política	Ross 308 = 0 Cobb 500 = 1
Temperatura promedio de la granja	Magnitud física que refleja la cantidad del calor del galpón	Temperatura promedio de la granja	Cuantitativa	Intervalo	Cualquier número
Humedad relativa promedio de la granja	Relación porcentual entre la cantidad de vapor de agua real que contiene el	Humedad relativa promedio registrada en la granja	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número. Unidad en porcentaje

	aire y la que necesitaría contener para saturarse a idéntica temperatura.				
Altitud	Distancia vertical de un punto de la tierra respecto al nivel del mar.	Distancia vertical de un punto de la tierra respecto al nivel del mar.	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número. Unidad msnm
Variables Globales					
Almacenamiento del lote de huevos	Tiempo transcurrido desde que el huevo llega a la incubadora y el ingreso a la maquina incubadora	Tiempo en días que el huevo permanece almacenado, desde que llega a la granja, hasta que ingresa a la maquina incubadora	Cuantitativa	Razón discreta	1-7
Método de desinfección del huevo	Proceso físico o químico que mata o inactiva agentes patógenos tales como bacterias, virus y protozoos impidiendo el crecimiento de microorganismos patógenos en fase vegetativa que se encuentren en la superficie del huevo	Método usado en granja para la desinfección del huevo	Cualitativa	Nominal dicotómica	Seca y húmeda = 0 Húmeda = 1
Historia de enfermedad	Historia de posibles	Semana de vida en que	Cuantitativa	Razón discreta	Cualquier número

previa en el lote de reproductoras	patologías que el lote haya sufrido	el lote se enfermó			
Tipo de piso	Clasificación del piso de la granja según el material que lo conforma	Material del que está hecho el piso del galpón	Cualitativa	Nominal dicotómica	Cemento = 0 Tierra = 1
Orientación del galpón	Orientación del galpón respecto al eje de la tierra	Orientación del galpón respecto al eje de la tierra	Cualitativa	Nominal dicotómica	Norte-sur = 0 Oriente-occidente = 1
Maquina incubadora	Aparato destinado a la incubación artificial de huevos	Número de la maquina a la que ingresa lote de huevos	Cuantitativa	Razón discreta	Cualquier número
Granja de procedencia	Espacio geográfico donde se encuentran las reproductoras	Granja donde están las reproductoras que produjeron el huevo	Cualitativa	Nominal politómica	Nombre propio de la granja
Municipio donde se ubica la granja	Entidad administrativa con un territorio definido	Municipio de Santander donde esta ubicada la granja de procedencia	Cualitativa	Nominal politómica	Girón = 1 Lebrija = 2 Piedecuesta = 3 Los Santos = 4
Lotes en la granja	Espacio geográfico en el cual se crían las gallinas en la granja. Se caracteriza porque todas las gallinas de un mismo núcleo tienen la misma edad.	Número de lotes de la granja	Cuantitativa	Razón discreta	Cualquier número según tamaño de la granja
Lote	Consecutivo del grupo general al que pertenece el galpón	Consecutivo del grupo de reproductoras al que pertenece el galpón	Cualitativa	Nominal politómica	Cualquier número de identificación del lote

Zona	Agrupación de granjas pertenecientes al dominio de un veterinario	Grupo de granjas asignadas a un mismo veterinario	Cualitativa	Nominal politómica	1 – 4
Distancia de la granja	Trayecto espacial que separa dos lugares	Distancia que existe entre la granja de procedencia y la incubadora a la que llegan los huevos	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número. Unidad en kilómetros
Fuente de agua	Fuente hidrográfica de la cual se extrae el agua de consumo para la granja	Fuente hidrográfica de la cual se extrae el agua de consumo para la granja	Cualitativa	Nominal politómica	Subterránea=0 Lago=1 Carro tanque=2
Numero de trabajadores por galpón	Personas encargadas del trabajo en el galpón	Número de personas que cuidan el grupo de reproductoras de un galpón	Cuantitativa	Razón Continua	Cualquier número

Anexo B: Pruebas del supuesto de distribución de Poisson para cada etapa de la ME

Mortalidad embrionaria	Valor p		
	Prueba de bondad de ajuste	Prueba de Varianza	Prueba asintótica
Temprana	<0,0001	0,0028	<0,0001
Intermedia	<0,0001	0,0479	<0,0001
Tardía	<0,0001	0,0076	<0,0001
Total	<0,0001	0,0003	<0,0001

Anexo C: Estimaciones del modelo nulo con efecto aleatorio para cada etapa de la ME

Nivel galpón				
Mortalidad embrionaria	Media*	IC 95%		Valor p**
Temprana	0,009	0,008	0,012	<0,001
Intermedia	0,004	0,003	0,005	<0,001
Tardía	0,011	0,009	0,012	<0,001
Total	0,013	0,012	0,015	<0,001
Nivel lote				
Temprana	0,008	0,007	0,009	<0,001
Intermedia	0,004	0,003	0,004	<0,001
Tardía	0,010	0,009	0,012	<0,001
Total	0,012	0,011	0,014	<0,001

* Media del conteo de muertes ponderado por los huevos fértiles a riesgo en cada etapa

** Prueba LR del modelo multinivel comparado con un modelo binomial negativo estándar

Anexo D: Análisis bivariado multinivel binomial negativo con efectos aleatorios en galpón para la mortalidad temprana, intermedia y tardía, de acuerdo características de los grupos de reproductoras para el día de postura, características de manejo de los huevos y hallazgos relevantes en el embriodiagnóstico para cada grupo (n=816)

Variable	MET			MEI			METa		
	IRR	IC 95%	Valor p*	IRR	IC 95%	Valor p*	IRR	IC 95%	Valor p*
Estirpe Cobb	Referencia		0,550	Referencia		0,245	Referencia		0,012
Ross	1,08	0,82	1,42	1,33	0,82	2,15	1,42	1,07	1,88
Transporte Controlado	Referencia		0,027	Referencia		<0,001	Referencia		<0,479
Abierto	0,86	0,76	0,98	0,51	0,42	0,61	0,95	0,84	1,08
Desinfección Seca y húmeda	Referencia		0,104	Referencia		0,022	Referencia		0,038
Húmeda	0,92	0,83	1,01	0,81	0,69	0,97	0,90	0,81	0,99
Incubadora 1	Referencia		<0,001	Referencia		<0,001	Referencia		<0,001
2	0,71	0,63	0,79	1,62	1,40	1,89	0,77	0,70	0,86
3	0,77	0,7	0,84	1,39	1,20	1,60	0,72	0,65	0,78
Temperatura granja Moderada	Referencia		<0,001	Referencia		0,114	Referencia		0,001
Alta	0,80	0,73	0,88	0,87	0,74	1,03	0,83	0,76	0,91
Edad (según guía) 25-30 semanas	Referencia		<0,001	Referencia		<0,001	Referencia		<0,001
31-45 semanas	0,86	0,76	0,96	1,12	0,91	1,37	0,70	0,63	0,78

46-50 semanas	0,87	0,75	1,02		1,45	1,11	1,88		0,75	0,66	0,86
51-64 semanas	1,05	0,92	1,20		1,97	1,55	2,49		0,91	0,81	1,02
Mes				<0,001				<0,001			<0,001
Octubre	Referenci a				Referenci a				Referencia		
Noviembre	0,76	0,66	0,88		0,92	0,72	1,17		0,99	0,87	1,12
Diciembre	0,92	0,79	1,08		1,09	0,83	1,42		1,13	0,98	1,30
Enero	0,83	0,73	0,94		1,06	0,85	1,31		0,80	0,71	0,90
Febrero	0,90	0,80	1,01		1,46	1,19	1,79		0,87	0,78	0,97
Marzo	1,35	1,20	1,53		2,76	2,24	3,39		0,91	0,80	1,03
Abril	1,05	0,91	1,22		2,32	1,84	2,94		0,77	0,66	0,90
Granja 1	Referenci a			<0,001	Referenci a			0,001	Referencia		<0,001
2	0,93	0,71	1,21		1,19	0,75	1,88		1,04	0,81	1,32
3	1,11	0,88	1,41		1,65	1,09	2,50		1,19	0,95	1,48
4	0,86	0,66	1,10		1,20	0,77	1,86		1,07	0,85	1,35
5	0,88	0,65	1,18		0,98	0,58	1,64		1,05	0,80	1,38
6	0,85	0,67	1,08		1,27	0,84	1,93		1,02	0,81	1,28
7	1,02	0,78	1,34		1,89	1,19	3,00		1,42	1,11	1,82
8	1,31	0,98	1,76		0,87	0,50	1,53		1,51	1,15	1,98
9	1,06	0,82	1,38		1,39	0,87	2,20		1,46	1,14	1,86
10	0,71	0,51	1,01		1,54	0,91	2,61		1,12	0,83	1,50
11	0,89	0,70	1,12		1,00	0,66	1,52		0,96	0,77	1,20
12	0,88	0,64	1,21		0,88	0,49	1,56		1,09	0,81	1,46
13	1,09	0,85	1,39		1,09	0,70	1,69		1,12	0,89	1,42
14	1,56	0,62	3,92		2,34	0,57	9,49		2,75	1,32	5,73
Municipio Los Santos	Referenci a			0,016	Referenci a			0,041	Referencia		0,008
Lebrija	1,09	0,97	1,22		1,17	0,96	1,43		1,09	0,98	1,22

Piedecuesta		0,91	0,81	1,01		0,88	0,72	1,07		0,90	0,81	1,01	
Edad (continua)		1,01	0,99	1,01	0,143	1,02	1,01	1,03	<0,001	1,00	0,99	1,01	0,275
Cantidad reproductoras	de	1	0,99	1	0,254	1	0,99	1	0,662	1	1	1	<0,001
Cantidad reproductores	de	1	0,99	1	0,162	1	0,99	1	0,847	1	1	1	<0,001
Relación macho	hembra:	0,99	0,96	1,02	0,581	1,05	0,99	1,12	0,060	1,01	0,97	1,03	0,622
% reproductoras	Mortalidad	0,95	0,68	1,33	0,791	0,91	0,53	1,58	0,759	0,88	0,65	1,19	0,429
% reproductores	Mortalidad	0,97	0,84	1,1	0,658	0,95	0,76	1,18	0,613	0,97	0,86	1,1	0,693
% Producción		0,99	0,99	0,99	<0,001	0,99	0,99	1,00	0,073	0,99	0,99	0,99	<0,001
% Huevo incubable		0,99	0,99	0,99	0,018	1,00	0,99	1,00	0,230	1	1	1	0,003
Almacenamiento (días)		1,02	1	1,03	0,009	1,03	1	1,06	0,009	1	0,98	1,01	0,547
Huevo cargado		0,99	0,99	0,99	0,011	1	0,99	1	0,857	0,99	0,99	0,99	<0,001
% Descarte a la transferencia		1,06	1,02	1,11	<0,001	1,05	0,98	1,12	0,135	1,04	1,00	1,08	0,021
% Infertilidad		1,06	1,05	1,07	<0,001	1,05	1,02	1,07	<0,001	1,07	1,06	1,09	<0,001
% Embriones posicionados	mal	1,19	1,16	1,22	<0,001	1,15	1,10	1,20	<0,001	1,27	1,25	1,29	<0,001
% Embriones malformaciones	con	1,56	1,42	1,7	<0,001	1,30	1,11	1,52	<0,001	1,55	1,42	1,69	<0,001
% contaminados hongos	Huevos con	1,32	0,87	2,01	0,189	0,88	0,43	1,82	0,748	1,18	0,77	1,81	0,443
% contaminados bacterias	Huevos con	1,4	1,31	1,49	<0,001	1,72	1,57	1,88	<0,001	1,35	1,27	1,43	<0,001
% Huevos con fisurada	cáscara	1,15	1,09	1,21	<0,001	1,22	1,14	1,31	<0,001	1,09	1,04	1,15	0,001

% Hembras nacidas 1 0,99 1 0,647 1 0,99 1,01 0,246 1 0,99 1 0,743
*Test de Wald. LR test para todas las variables fue p<0,001
