

**DETERMINACIÓN DE PÉRDIDAS DE INCUBABILIDAD MEDIANTE OVOSCOPIA Y
EMBRIODIAGNOSIS**

HILDA ABRIL GONZÁLEZ

CÓDIGO: 150214201

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
FUSAGASUGÁ**

2020

**DETERMINACIÓN DE PÉRDIDAS DE INCUBABILIDAD MEDIANTE OVOSCOPIA Y
EMBRIODIAGNOSIS**

DIRECTOR:

HERNÁN NIÑO NIÑO

CO-DIRECTOR:

JEHISON TORRES TORRES

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
FUSAGASUGÁ**

2020

Contenido

1. Objetivos.....	1
Objetivo general.....	1
Objetivo específico	1
2. Resumen.....	2
3. Introducción.....	3
4. Planteamiento del problema.....	4
5. Justificación.....	5
6. Marco referencial.....	6
6.1. Incubabilidad.....	7
6.2. Desarrollo embrionario.....	8
6.3. Mortalidad embrionaria.....	9
6.4. Factores que afectan la incubabilidad en la planta de incubación.....	10
6.5. Pruebas diagnósticas.....	10
6.5.1. Procedimiento de embriodiagnos.....	11
6.6. Análisis de datos.....	12
6.7. Perdidas de incubabilidad.....	13
7. Conclusiones.....	20
8. Referencias bibliográficas.....	42

Lista de imágenes

Imagen 1. Procesos en la planta de incubación.....	7
Imagen 2. Rangos óptimos de temperatura del huevo incubable.....	7
Imagen 3. Fisuras en huevos incubables.....	15
Imagen 4. diferentes estados de desarrollo después de la oviposición.....	15
Imagen 5. Membrana corioalantoidea	20
Imagen 6. Etapa 7.....	23
Imagen 7. Etapa 11.....	23
Imagen 8. Etapa 20 (70-72 horas).....	24
Imagen 9. Etapa 23 (4 días)	24
Imagen 10. Etapa 26 (6 días).....	24
Imagen 11. Etapa 29 (6 - 6,5 días).....	24
Imagen 12. Etapa 31 (7 - 7,5 días).....	25
Imagen 13. Etapa 34 (8 días).....	27
Imagen 14. Etapa 35 (8 - 9 días)	27
Imagen 15. Etapa 36 (10 días).....	28
Imagen 16. Embrión de 10 días.....	28
Imagen 17. Etapa 37 (11 días).....	29
Imagen 18. Etapa 38 (12 días).....	30
Imagen 19. Etapa 39 (13 días).....	30
Imagen 20. Etapa 40 (14 días).....	31
Imagen 21. Etapa 41 (15 días).....	31
Imagen 22. Etapa 42 (16 días).....	32
Imagen 23. Etapa 43 (17 días)	33
Imagen 24. Etapa 44 (18 días).....	33
Imagen 25. Etapa 45 (19 - 20 días).....	34
Imagen 26. Embrión 24 horas.....	23

Imagen 27. Embrión 44 horas.....	23
Imagen 28. Embrión 72 horas.....	24
Imagen 29. Embrión 4 días.....	24
Imagen 30. Embrión 5 días.....	24
Imagen 31. Embrión 6 días.....	24
Imagen 32. Embrión 7 días.....	25
Imagen 33. Embrión 7 días (acercamiento).....	25
Imagen 34. Embrión 7 días (membranas extra embrionarias).....	26
Imagen 35. Embrión 8 días.....	27
Imagen 36. Embrión 9 días.....	27
Imagen 37. Embrión 10 días.....	28
Imagen 38. Embrión 10 días (membranas extra embrionarias).....	28
Imagen 39. Embrión 10 días (acercamiento).....	29
Imagen 40. Embrión 11 días.....	29
Imagen 41. Embrión 12 días.....	30
Imagen 42. Embrión 12 días (membranas extra embrionarias).....	30
Imagen 43. Embrión 14 días.....	31
Imagen 44. Embrión 15 días.....	31
Imagen 45. Embrión 16 días.....	32
Imagen 46. Embrión 17 días.....	33
Imagen 47. Embrión 18 días.....	33
Imagen 48. Embrión 19 días.....	34
Imagen 49. Huevo infertil.....	36
Imagen 50. Huevo fértil (mortalidad embrionaria 1 - 2 días).....	36
Imagen 51. Mortalidad embrionaria 3 - 4 días.....	36
Imagen 52. Mortalidad embrionaria 5 días.....	36
Imagen 53. Mortalidad embrionaria 6 días.....	37
Imagen 54. Mortalidad embrionaria 7 días.....	37

Imagen 55. Mortalidad embrionaria 8 días.....	37
Imagen 56. Mortalidad embrionaria 10 días.....	38
Imagen 57. Mortalidad embrionaria 11 días.....	38
Imagen 58. Mortalidad embrionaria 12 días.....	38
Imagen 59. Mortalidad embrionaria 13 días.....	39
Imagen 60. Mortalidad embrionaria 14 días.....	39
Imagen 61. Mortalidad embrionaria 16 días.....	40
Imagen 62. Mortalidad embrionaria 17 días.....	40
Imagen 63. Mortalidad embrionaria 19,5 días.....	41
Imagen 64. Mortalidad embrionaria 20 días.....	41

Lista de tablas

Tabla 3. Pruebas diagnósticas.....	10
Tabla 4. Formato de embriodiagnosisis.....	11
Tabla 5. Guía de embriodiagnosisis línea Ross AP.....	12
Tabla 6. Patrón normal de mortalidad embrionaria durante la incubación	13
Tabla 7. Los factores en granja asociados a pérdidas de incubabilidad por infertilidad.....	14
Tabla 8. Factores asociados a pérdidas de incubabilidad por mortalidad temprana.....	14
Tabla 9. Factores asociados a pérdidas de incubabilidad por mortalidad intermedia.....	16
Tabla 10. Factores asociados a pérdidas de incubabilidad por mortalidad tardía.....	17

Anexos

Tabla 1. Desarrollo embrionario tabla normal (Hamburger y Hamilton 1951) vs ovoscopía.....	23
Tabla 2. Características externas del embrión para clasificación de mortalidad embrionaria por medio de embriodiagnosisis.....	36

1. Objetivos

Objetivo general

Realizar una revisión sistemática de literatura concerniente a pérdidas de incubabilidad en plantas de incubación avícola.

Objetivos específicos

- 1.1. Compilar los principales factores asociados a mortalidad embrionaria que se presentan en el proceso de incubación en líneas de aves pesadas.
- 1.2. Comparar las técnicas utilizadas para clasificar la mortalidad embrionaria por fase de desarrollo, basado en las características externas del embrión.

2. Resumen

El propósito de esta monografía fue realizar una revisión literaria de las pruebas diagnósticas embriodiagnos y ovoscopia aplicadas para determinar las pérdidas de incubabilidad asociadas a mortalidad embrionaria (ME) e infertilidad, durante el proceso de incubación en huevos de la estirpe Ross AP, principal línea manejada en Colombia para la producción de pollito de engorde BB., El seguimiento durante la incubación, por medio de embriodiagnos, a huevos provenientes de reproductoras en periodo productivo (edades comprendidas entre 25 a 68 semanas), permite identificar la distribución de las pérdidas de los huevos que no eclosionaron, y diferenciar la infertilidad de la mortalidad embrionaria ocurrida dentro de las 504 \pm 3 horas de incubación en función del tiempo de desarrollo embrionario, los índices obtenidos de infertilidad y ME en fase 1 MET (1-3,3-4 y 5-7 días), fase 2 MEI (8-11 y 12-14 días) y fase 3 METa (15-17, 18-19 y 19-21 días) esta última a su vez clasificada en picados vivos (PV), picados muertos (PM), malformados (MF) y mala posición (MP), se contrastan con los estándares de la estirpe y con los resultados de las pruebas de control de calidad estandarizadas en las plantas de incubación con el objetivo de identificar desviaciones del patrón normal de mortalidad embrionaria e infertilidad.

Palabras clave: Broiler, embriodiagnos, incubación.

3. Introducción

Los productos de origen animal de mayor consumo per capita en Colombia en el año 2019 fueron, la carne de pollo 35,6 Kg, la carne de bovino 18,6 Kg y los huevos con un consumo promedio anual de 303 unidades, (Fenavi-Fonav 2019). Según la Asociación Latinoamericana de Avicultura (ALA); la industria avícola de nuestro país junto a Brasil, Mexico, Argentina, Perú y Chile aportan el 88% (26,118,250 toneladas métricas) de la producción de carne de pollo de la región; el subsector incubación, se considera como uno de los eslabones más importante dentro de la cadena de producción avícola, debido a que provee los pollitos de reemplazos (ponedoras, reproductores ligeros y pesados) y la producción de pollitos de engorde que son los pilares fundamentales para la continuidad del rubro aviar (Espinoza-Gutierrez & Matey-Lechado, 2010).

La mortalidad embrionaria es un problema de gran importancia económica en la industria avícola. A principios del siglo XX, cuando los lotes eran pequeños 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 ME frecuentemente alcanzaba el 25% o más (Romanoff, 1949). Actualmente, el desarrollo de líneas especializadas, su selección hacia parámetros ideales de producción 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 deseables en el proceso de incubación.

La ME en pollos no se distribuye uniformemente durante los 21 días de incubación y se ha establecido, por medio de modelos matemáticos, que la curva de mortalidad presenta dos picos durante las diferentes fases del desarrollo, los cuales ocurren en la primera y tercera semana y están relacionados con los cambios en el metabolismo de los embriones (Jassim,1996), edad de las reproductoras y manejo de huevo fértil. En consecuencia, la ME se dividió en temprana, intermedia y tardía.

la primera aplicación específica de la embriodiagnos en la evaluación de los puntos críticos de las incubadoras y nacedoras fue realizada por Martin (2002) y Mauldin (2001) este último autor, además, introdujo la embriodiagnos en el programa de control de calidad de la planta de incubación. En nuestro país, son escasas las publicaciones sobre la evaluación del proceso de incubación, y las existentes se refieren a aspectos metodológicos (Vanegas, 2014) o son caracterizaciones de patrones de ME (Peñuela,2017).

En Colombia en el año 2018, el número de aves que entraron a hacer parte de la población avícola fue de 840 millones, 60 millones más que en el 2017, representando un crecimiento proyectado de 2%. Considerando que el sector avícola es el primer productor de carne en el país, con un consumo per cápita de 35,6 Kg, es indispensable conocer los factores que generan pérdidas de incubabilidad y las pruebas diagnósticas empleadas para identificar los cambios en los patrones de ME e infertilidad bajo condiciones de producción propias de nuestro país, esto servirá como fuente de orientación para realizar ajustes en el proceso de incubación.

4. Planteamiento del problema

La falta de eclosión de los huevos afecta la eficiencia productiva y es de interés económico en la industria avícola, por cada disminución porcentual en los pollitos vendibles nacidos a partir de huevos incubados el costo para producir un pollito de engorde vendible aumenta aproximadamente 1.2%. Según el Programa de Estudios Económicos Fenavi-Fonav del 2018, Colombia cuenta con 39 plantas de incubación certificadas, con una producción mensual de 71.9 millones de pollitos. Considerando el razonamiento anterior por cada disminución en un punto porcentual en la producción de pollito Broiler BB, mensualmente dejarían de encasetarse 719,000 pollitos que representarían aproximadamente 1000 toneladas de carne no producidas.

La falta de eclosión de los huevos está determinada por dos factores: infertilidad y mortalidad embrionaria antes y durante la incubación. El tiempo de mortalidad embrionaria no se distribuye uniformemente durante el período de incubación de 21 días, el tiempo de mayor mortalidad, en cambio, se distribuye en dos fases: la primera fase que ocurre durante la primera semana, y la segunda fase que ocurre durante la tercera semana de incubación (Kuurman,2003); la recopilación de datos precisos sobre infertilidad, incubabilidad y el tiempo y la naturaleza de las pérdidas de embriones por medio de pruebas diagnósticas como ovoscopías y embriodiagnos, definiendo esta última como el diagnóstico de la mortalidad embrionaria realizado a partir de la apertura de los huevos que quedaron sin eclosionar en las bandejas de nacedoras (Plano y Di Mateo, 2001), permiten comparar el rendimiento de la planta de incubación con las guías de manejo estándar de la línea genética y proporcionar la línea de base para investigar problemas de incubabilidad.

Al identificar factores que generan desviaciones en el patrón normal de mortalidad embrionaria es posible identificar los errores, detectar las probables causas y proponer soluciones. Su aplicación, como parte de un programa de calidad, se refleja en la economía del sistema productivo avícola a través de la obtención de un mayor número de pollitos nacidos.

5. Justificación

Según (Fenavi-Fonav, 2018), durante el año 2018 se presentó una producción de 1.6 millones de toneladas de pollo entero sin vísceras y un consumo per cápita de 32.8 kilogramos. Por otra parte, en Colombia, durante el año 2018 se encasetaron un total de 744.6 millones pollos de engorde y para este año, la avicultura colombiana espera un crecimiento del 6%. Según las perspectivas alimentarias y el análisis del mercado mundial realizado por la FAO en el año 2014, la demanda de carne en los países de ingresos bajos y medios aumentará en un 80% para el 2030; Sobre el componente de alimentación, la avicultura proporciona alimentos de primera necesidad y proteína de alto valor biológico a un bajo costo, que contribuyen a garantizar la soberanía alimentaria y a mejorar la calidad de las dietas.

Para cumplir con el margen de producción proyectado las tasas de mortalidad embrionaria se deben mantener por debajo del estándar con el fin de mejorar las tasas de eclosión y obtener de un mayor número de pollitos nacidos. A través de la identificación de indicadores sub-óptimos mediante embriodiagnos, ovoscopia y procedimientos de control de calidad de pollito es posible resolver problemas que puedan ocurrir desde la puesta hasta la eclosión, la recopilación de información sobre infertilidad, incubabilidad, el tiempo y la naturaleza de las pérdidas de embriones son una parte importante del programa de control de calidad en las plantas de incubación y permiten sugerir prácticas alternativas de gestión dentro del proceso y adaptar las rutinas de control de calidad para monitorear los resultados de cualquier cambio que se realice y prevenir recurrencia de los mismos problemas.

6. Marco referencial

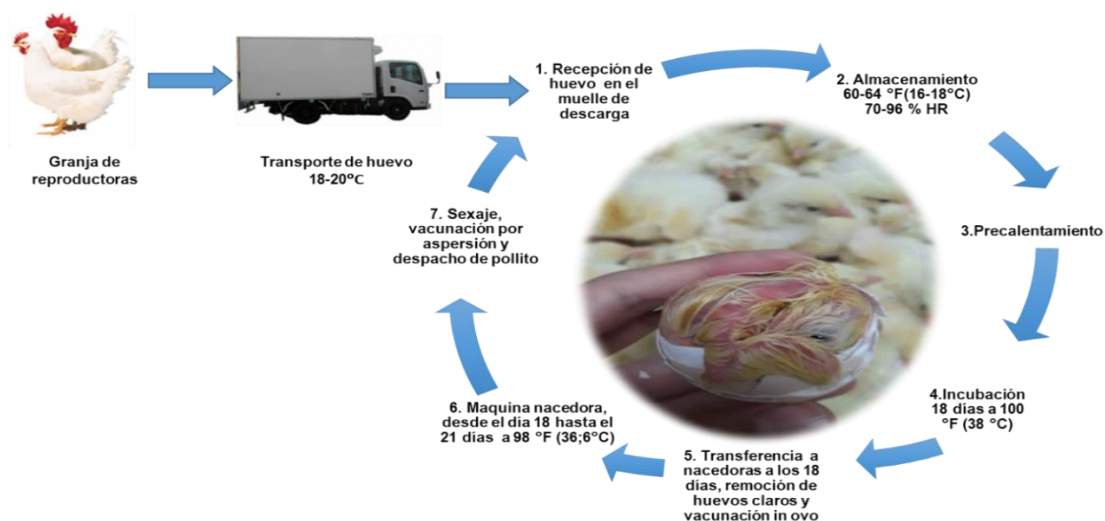
A lo largo de la cadena de producción en una planta de incubación se llevan a cabo los procesos referidos en la imagen 1. El proceso en la planta inicia una vez los huevos ingresan a cuarto frío, donde son almacenados a una temperatura entre 16 a 20°C por un periodo máximo de 7 días dependiendo la situación de demanda de la industria del pollo de engorde y de la planta incubadora. después se realiza la selección y clasificación por tamaño, forma y limpieza, posteriormente los huevos sentados se cargan en las maquinas incubadoras las cuales se encargan de simular las condiciones ambientales en las que las gallinas incuban sus huevos naturalmente.

Las incubadoras artificiales controlan los parámetros de temperatura, humedad y volteo, que permiten el desarrollo fisiológico de los embriones; el cual se logra a una temperatura de 37°C y a una humedad relativa entre 83.6 – 84%; antes de iniciar el perfil de incubación se debe llevar a cabo un atemperado de máximo 12 horas a una temperatura de 24 -27 °C para evitar un choque térmico y condensación de los huevos.

La temperatura puede tener un efecto divergente o bifásico durante el curso de la incubación. El aumento de la temperatura inicialmente acelera el crecimiento embrionario y la utilización de nutrientes y energía de la yema y la albúmina, pero a medida que avanza la incubación, la exposición a altas temperaturas constantes disminuye el crecimiento embrionario (Noiva, Menezes, & Peleteiro, 2014) Es necesario disminuir el nivel de temperatura durante los últimos días (2 a 3) de incubación, es decir, que la temperatura se ajusta según las etapas de incubación, al final de la incubación, cuando la tasa de calor metabólico del embrión es alta, la disminución de la temperatura estimula el consumo de los nutrientes acelerando el metabolismo y el desarrollo en los embriones.

Uno de los subproductos del metabolismo que ocurre durante la incubación es el agua; el embrión debe eliminar el exceso de agua para poder eclosionar. Durante la incubación un huevo pierde peso debido a la evaporación de agua; esta pérdida de peso es esencial para crear una suficiente cámara de aire que permita la ventilación pulmonar embrionaria, después del picado interno y una exitosa eclosión. Una alta tasa de eclosión es alcanzada cuando exista una pérdida de agua de 12 a 14 % del peso del huevo al momento de incubar, hasta el momento de la transferencia (Barbosa, et al; 2012; Van der Pol, et al; 2013).

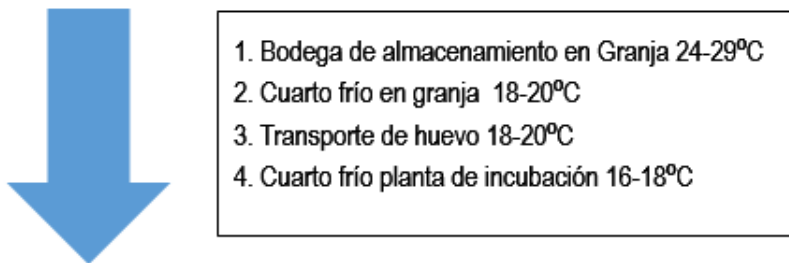
Imagen 1. Procesos en la planta de incubación



Fuente: Autor

Las fluctuaciones de temperatura se deben evitar en el transporte y almacenamiento del huevo, por lo tanto, la disminución en la temperatura debe ser gradual desde la granja de reproductoras hasta el cuarto frío en la incubadora como se observa en la imagen 2. De la misma manera se debe manejar la transición en la temperatura de precalentamiento de los huevos de cuarto frío a la maquina incubadora para evitar un choque de temperatura del embrión y una condensación de la cáscara, los huevos deben ser removidos de la sala de huevos y pre-calentarlos antes de la carga. Lo ideal, es que los huevos se precalienten en una sala diseñada para esto a una temperatura de 24 -27 °C (75-80 °F) de manera que todos los huevos puedan alcanzar la temperatura deseada. La circulación efectiva del aire y la correcta temperatura de la sala son esenciales para alcanzar un precalentamiento uniforme de todos los huevos. Un precalentamiento desuniforme aumenta la variación del tiempo de nacimientos, precisamente el efecto contrario al deseado en el precalentamiento

Imagen 2. Rangos óptimos de temperatura del huevo incubable



Fuente: Autor

6.1. Incubabilidad

En un escenario comercial, La incubabilidad es la cantidad pollitos viables de primera calidad, que son aptos para la crianza y está influenciado por múltiples factores que son responsabilidad de las granjas de reproductores y de las plantas de incubación; es un indicador que se calcula respecto a la cantidad de huevos cargados en la incubadora, expresado en porcentaje (Schmidt, 2003). El éxito de una incubadora se mide por el número de pollitos producidos de primera calidad por lo tanto puede ser necesario llevar a cabo una investigación detallada si en la incubabilidad o en el pollito surgen problemas de calidad. El rendimiento se ve afectado por las condiciones experimentadas por los huevos desde la oviposición hasta eclosión. Así que, cualquier investigación en la planta de incubación debe abarcar todos los eventos entre el momento en que se pone el huevo hasta el inicio de la cría en la granja. El desempeño de los polluelos durante la primera semana en la granja, especialmente los niveles de mortalidad y los pesos corporales también deben ser examinados. Aunque el rendimiento de los pollitos está influenciado por el manejo en la granja, el impacto inicial de los procedimientos en la planta de incubación a menudo se subestima y también debe considerarse cuando surgen problemas. La planificación cuidadosa de cualquier investigación durante la incubación asegurará que el material examinado sea representante del sistema en su conjunto (Sandoval et al, 2005).

6.2. Desarrollo embrionario

La embriogénesis de aves tiene lugar en un ambiente relativamente protegido que puede manipularse especialmente bien en aves domésticas (pollos) donde la incubación ha sido durante mucho tiempo un proceso comercial. Se ha demostrado que el proceso de desarrollo embrionario comienza en el

oviducto de tal manera que el embrión ha alcanzado la etapa de desarrollo blastodérmico y / o gastrulación en la oviposición (Kuurman,2002). Los embriones de aves pueden verse afectados por los "efectos maternos" y por las condiciones ambientales durante los períodos de preincubación e incubación. En general, los efectos maternos sobre la progenie, que tienen un componente tanto genético como ambiental representado por la deposición de hormonas de la yema y la utilización de nutrientes embrionarios, tienen un efecto importante en el desarrollo de una amplia gama de rasgos de progenie (Reijrink, 2008). Además, el desarrollo comercial del embrión durante el almacenamiento previo a la incubación y la incubación, así como durante la incubación per se, depende en gran medida de la temperatura, mientras que otros factores ambientales que incluyen la posición del huevo durante el almacenamiento y la cantidad de H₂O y CO₂ perdida por el huevo y el efecto posterior sobre el pH y la altura de la albúmina durante el almacenamiento se han convertido en factores ambientales importantes a considerar para una embriogénesis exitosa en condiciones comerciales. (Kuurman,2003). La manipulación de la temperatura ambiental durante el período de almacenamiento del huevo, durante el período de precalentamiento y el período de incubación per se afecta significativamente el desarrollo del embrión, el progreso de la eclosión, la calidad del pollito en la eclosión y el desarrollo del pollito después de la eclosión. También se ha demostrado que estas manipulaciones de temperatura afectan la adquisición de termotolerancia al posterior desafío térmico posterior a la eclosión (Tona et al, 2001).

6.3. Mortalidad embrionaria

La mortalidad embrionaria se analiza, en general, comparando la proporción de mortalidad durante cada período discreto de incubación entre los huevos fértiles puestos e incubados, y comparando estas proporciones dentro o entre nacimientos (Payne, 1919; Byerly, 1930; Whitehead et al., 1985; Mujeer et al., 1986; Yoo y Wientjes, 1991; Scott y Mackenzie, 1993). Sin embargo, aunque la mortalidad embrionaria es un proceso continuo durante la incubación ME en pollos no se distribuye uniformemente durante los 21 días de incubación y se ha establecido, por medio de modelos matemáticos, que la curva de mortalidad presenta dos picos durante las diferentes fases del desarrollo, los cuales ocurren en la primera y tercera semana y están relacionados con los cambios en el metabolismo de los embriones (Jassim, 1996, Kuurman y Grossman 2003). En consecuencia, la ME se dividió en temprana, intermedia y tardía. (Peñuela, 2017)

La falta de eclosión de los huevos está determinada por dos factores: infertilidad y mortalidad embrionaria antes y durante la incubación. El tiempo de mortalidad embrionaria no se distribuye uniformemente durante el período de incubación de 21 días de un huevo de gallina. El tiempo de aumento de la mortalidad, en cambio, se distribuye en dos fases: la primera fase que ocurre durante la primera y segunda semana de incubación y la segunda fase que ocurre durante la tercera semana (Payne, 1919; Peñuela, 2017). El aumento de la mortalidad embrionaria durante la incubación se atribuye a los cambios en el funcionamiento fisiológico y de desarrollo del embrión y tiene causas genéticas y ambientales (Brake, 1999).

La ME temprana (MET) sucede en la primera semana de incubación (Liptoi K, 2006). Se observa que es especialmente alta entre el día 3 y 5 y se presume que ocurre a causa del cambio en la eliminación del CO₂, o por hidronefrosis (Peebles, 2001) que resulta de una obstrucción mecánica del mesonefros, cuando este órgano comienza a funcionar (Liptoi K, 2006). Romanoff en 1949 mencionó otras causas posibles de MET, dentro de las que se incluye un desajuste respiratorio antes del establecimiento de la superficie respiratoria (correspondiente al área vascular y a la corioalantoides) que aparece en los primeros 3 ó 4 días de desarrollo embrionario. 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, hay una concentración máxima de ácido láctico al tiempo que la enzima que lo desdobra está presente en pequeñas cantidades. Adicionalmente se reportó que el nitrógeno en el período de desarrollo temprano es excretado en forma de amonio, el cuál es muy tóxico para el embrión (Motorola, 2010).

Durante la segunda semana de incubación ocurre la ME intermedia (MEI) la cual generalmente es baja debido a que el embrión ha superado la etapa crítica de la organogénesis.

La ME tardía (METa) ocurre durante la tercera semana de incubación y tiende a aumentar hacia el día 19, cuando la demanda de oxígeno del embrión se incrementa significativamente (Liptoi K, 2006). Puede ser causada por una falla en la transición de la respiración alantoidea a la pulmonar. Al final del período de desarrollo, los efectos acumulativos de condiciones de incubación desfavorables pueden resultar en pobre viabilidad del embrión y los cambios anormales en el estado fisicoquímico de los fluidos del embrión que son especialmente importantes (Metzger,2011).

Un aspecto que contribuye a la variabilidad de la ME es la edad de las reproductoras (Yassin,2018). Las reproductoras entran en fase de producción alrededor de la semana 25 y se espera que alcancen la semana 68 con los estándares de los parámetros establecidos bajo condiciones de producción ideales en países industrializados. Sin embargo, está claro que las características de producción cambian con la edad del lote, por lo que a medida que la edad aumenta los valores esperados de ME también cambian (Ulmer, 2010).

6.4. Factores que afectan la incubabilidad en la planta de incubación

El desarrollo embrionario no debe considerarse como algo aislado de las condiciones del medio que rodea a los huevos durante la incubación. Existe una determinada interrelación entre el medio del huevo y el medio externo que lo rodea, y como en todo sistema, existen agentes adversos que se deben tomar en cuenta para explicar ciertos índices de incubabilidad altos o bajos. Los cambios que tienen lugar en el huevo durante la incubación se presentan ordenados y regidos por leyes naturales. Estos cambios se producen, con normalidad, solamente bajo niveles determinados de temperatura, humedad, contenido químico del aire, posición del huevo, así como la limpieza de las máquinas (Vaca, 1999; Solano,2009). Cualquier desajuste en alguno de los factores anteriores, puede provocar grandes diferencias en la cantidad y calidad de los pollitos que se obtengan.

Para lograr identificar los posibles factores que afectan la incubabilidad, es necesario conocer el proceso de desarrollo del embrión y las características externas que permitan clasificar la mortalidad embrionaria por fase de desarrollo, con el objetivo de poder ubicar posibles causas de mortalidad embrionaria según el período en el que se presente como se ejemplifica en la tabla 1 y 2 (ver anexos).

6.5. Pruebas diagnósticas

En la tabla 3 se describen los procesos de ovoscopia y embriodiagnosis que se realizan rutinariamente en las plantas de Incubación para el análisis de la evolución de los embriones en el proceso.

Tabla 3. Pruebas diagnosticas

Prueba diagnóstica	Descripción
	Observación desde el día 5 de incubación y consiste en proyectar un rayo de luz sobre el huevo, generando un efecto de translucidez, que permite visualizar en cierta forma el interior del

6.6. Análisis de datos

Se toma el tamaño de la muestra analizada, y se aplica la fórmula para calcular índices ponderados, dondelos valores obtenidos de infertilidad y mortalidad embrionaria, se ponderan sobre el total del huevo incubado del lote. Se deben tener en cuenta el número total de los huevos no eclosionados para multiplicarlo por cada valor hallado de cada fase durante la embriodiagnos. Al resultado se lo divide el universo total de huevos puestos a incubar pertenecientes al plantel analizado. Posteriormente se divide este resultado por los huevos remanentes analizados de la muestra

fórmula para calcular índices ponderados

$$(A \times B) / C = Na$$

$$(N / H) \times 100 = \text{índice por ítem o fase analizada.}$$

Donde:

A: Es el número de huevos de un ítem o fase analizada

B: Es el número total de huevos, del lote de reproductoras analizado, de los que no hubo eclosión de pollitos.

C: Es el universo total de huevos puestos a incubar del lote analizado

N: Media ponderada, resultante de la operación anterior.

H: Es la cantidad real de huevos remanentes (sin eclosionar), analizados en la muestra.

Los índices obtenidos durante la embriodiagnos, sirven para fines diagnósticos estos se contrastan con valores normales o estándares de la línea genética según la edad del lote de reproductoras; en la tabla 5 se referencian los objetivos máximos de pérdidas de incubabilidad /índices de mortalidad embrionaria e infertilidad establecidos por la línea genética) las categorías que muestren las mayores desviaciones del objetivo indicarán dónde se están originando los problemas;

Tabla 5. Guía de embriodiagnos línea Ross AP

Guía de embriodiagnos línea Ross AP									
Edad Reproductoras	% Infértiles	% MET	% MEI	% METa	% Rotos	% Bacterias	% Hongos	% Desechos	% Nacimiento
25	16,64	6,46	1,30	4,0	0,40	0,40	0,00	0,80	68,00
26	11,64	5,86	1,30	4,0	0,40	0,40	0,00	0,80	73,00
27	9,37	5,57	1,00	3,7	0,40	0,40	0,00	0,65	78,00
28	7,34	5,31	0,80	3,5	0,40	0,40	0,00	0,55	83,50
29	5,78	5,06	0,60	3,3	0,40	0,40	0,00	0,45	85,50
30	4,39	4,84	0,50	3,2	0,40	0,40	0,00	0,40	87,50
31	3,45	4,52	0,50	3,1	0,35	0,35	0,00	0,35	88,50
32	2,81	4,27	0,50	3,0	0,35	0,35	0,00	0,30	88,50
33	2,43	4,15	0,50	3,0	0,35	0,35	0,00	0,25	88,90
34	2,12	4,05	0,50	2,9	0,35	0,35	0,00	0,20	88,90
35	2,06	3,95	0,50	2,9	0,35	0,35	0,00	0,20	89,30

36	2,01	3,84	0,50	2,9	0,35	0,35	0,00	0,20	89,10
37	2,14	3,74	0,50	2,8	0,35	0,35	0,00	0,20	89,00
38	2,35	3,65	0,50	2,8	0,35	0,35	0,00	0,20	89,00
39	2,54	3,58	0,50	2,8	0,35	0,35	0,00	0,20	88,70
40	2,80	3,53	0,50	2,8	0,35	0,35	0,00	0,20	88,60
41	3,09	3,50	0,50	2,8	0,40	0,40	0,00	0,25	88,30
42	3,32	3,49	0,50	2,8	0,45	0,48	0,00	0,30	88,00
43	3,64	3,49	0,50	2,8	0,45	0,50	0,00	0,35	87,70
44	3,90	3,51	0,50	2,8	0,45	0,51	0,00	0,35	87,50
45	4,33	3,55	0,50	2,8	0,45	0,52	0,00	0,35	87,30
46	4,69	3,61	0,50	2,8	0,50	0,53	0,00	0,35	86,90
47	5,17	3,68	0,50	2,8	0,50	0,55	0,00	0,35	86,60
48	5,48	3,78	0,50	2,9	0,54	0,57	0,00	0,35	86,10
49	5,96	3,89	0,50	2,9	0,59	0,59	0,00	0,35	85,40
50	6,31	4,02	0,50	3,0	0,65	0,61	0,00	0,35	84,60
51	6,61	4,16	0,50	3,0	0,70	0,64	0,00	0,38	84,00
52	7,08	4,33	0,50	3,1	0,76	0,67	0,00	0,40	83,10
53	7,51	4,51	0,50	3,1	0,82	0,68	0,00	0,45	82,40
54	7,82	4,71	0,50	3,2	0,88	0,70	0,00	0,50	81,30
55	8,20	4,93	0,50	3,3	0,94	0,71	0,00	0,55	80,30
56	8,65	5,16	0,50	3,4	1,00	0,73	0,00	0,60	79,30
57	9,14	5,42	0,50	3,5	1,06	0,74	0,00	0,65	78,20
58	9,52	5,69	0,50	3,6	1,12	0,76	0,00	0,70	77,40
59	9,81	5,98	0,50	3,8	1,18	0,77	0,00	0,75	76,50
60	10,21	6,29	0,50	4,0	1,24	0,79	0,00	0,80	75,50
61	10,84	6,38	0,50	4,2	1,30	0,80	0,00	0,85	74,50
62	10,98	6,98	0,50	4,3	1,36	0,82	0,00	0,90	73,50
63	11,35	7,28	0,50	4,6	1,42	0,83	0,00	0,95	72,50
64	11,77	7,78	0,50	4,9	1,49	0,85	0,00	1,00	71,50
65	12,00	8,09	0,50	5,0	1,90	0,90	0,00	1,25	70,50

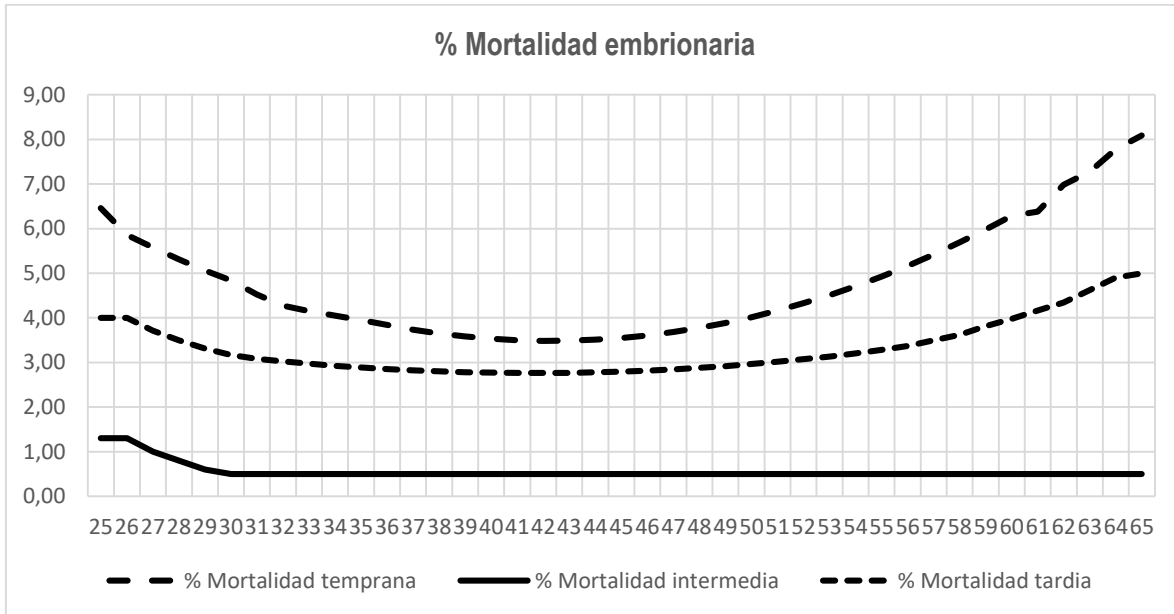
Fuente: Ross AP

6.7. Perdidas de incubabilidad

La evaluación adecuada de los factores que contribuyen al fracaso de la eclosión de un huevo, es decir, infertilidad y mortalidad embrionaria, es importante en la producción avícola (kurman 2003) Desde los primeros reportes de Payne en 1919 se observó que los embriones no morían uniformemente durante los 21 días de incubación, y 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 mortalidad (Payne 1919). A partir de esto, se desarrollaron modelos matemáticos multifásicos para caracterizar la distribución de la ME donde se ratificó este patrón (peñuela 2018), en la tabla 6 se

observa el patrón de mortalidad embrionaria normal en las fases temprana, intermedia y tardía según la edad de las reproductoras.

Tabla 6. Patrón normal de mortalidad embrionaria durante la incubación



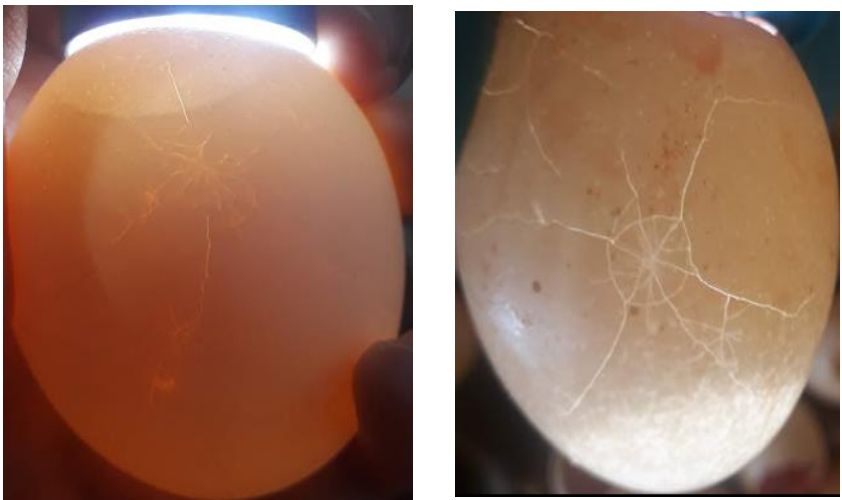
El aumento de la mortalidad embrionaria durante la incubación se atribuye a los cambios en el funcionamiento fisiológico y del desarrollo del embrión y tiene causas genéticas y ambientales (Byerly, 1930; Moseley y Landauer, 1949; Rol'nik, 1970) por lo tanto definir el comportamiento de la ME, permite tener una base para medir el comportamiento de un parámetro clave en incubación y ejercer control ante la evidencia de cambios anormales y condiciones adversas que puedan alterar cada una de las etapas de desarrollo del embrión, y que además, estén sujetas a modificación ante la implementación de medidas correctivas (Peñuela, 2007); en las tablas 7,8,9 y 10 se observan los factores en granja, y planta de incubación asociados a pérdidas de incubabilidad por infertilidad y mortalidad embrionaria temprana, intermedia y tardía.

Tabla 7. Factores en granja asociados a pérdidas de incubabilidad por infertilidad

Factores asociados a pérdidas de incubabilidad	
Lugar	Infertilidad
Granja	<p>Los machos con sobrepeso tienen una conformación corporal más horizontal por el exceso de tamaño de la pechuga, lo que les impide realizar montas completas con facilidad, se observan patas y zona de la cloaca con deficiente pigmentación y sin desgaste de las plumas, signo de apareamiento infrecuente.</p> <p>Machos reproductores expuestos al estrés por calor; cuando los espermatozoides están fuera de los túbulos de almacenamiento de esperma de la gallina en la unión uterovaginal (UVJ) y el infundíbulo pueden fácilmente destruirse a sí mismos. Debido a que los espermatozoides contienen enzimas que sostienen el metabolismo y ayudan a la penetración del óvulo, estas enzimas también pueden dañar o destruir los espermatozoides a través de la</p>

	<p>actividad proteolítica. Esto puede ocurrir especialmente cuando el semen se incuba por encima de la temperatura corporal normal del ave (Karaca et al. 2002)</p> <p>Cuando el semen de pollo se expone a temperaturas elevadas, las concentraciones de Ca ++ intracelular disminuyen, este juega un papel importante en la motilidad debido a que la reacción del acrosoma disminuye a concentraciones bajas de Ca ++ libre intracelular (Ashizawa et al., 1999)</p> <p>Relación macho- hembra inadecuada</p>
--	--

Tabla 8. Factores asociados a pérdidas de incubabilidad por mortalidad temprana

Factores asociados a pérdidas de incubabilidad	
Lugar	Mortalidad Temprana
<p>Granja</p>	<p>Las microfisuras en la cáscara como se observan en la imagen 3, aumentan el riesgo de contaminación horizontal por microorganismos patógenos y alterantes (Solano, 2009) y disminuye la incubabilidad hasta un 25%, además una proporción de cascara menor al 10% aumentan el escape de CO₂, generando un desequilibrio ácido-base y finalmente la muerte del embrión (Reis et al. 1997).</p> <p>Imagen 3. Fisuras en huevos incubables</p> <div data-bbox="474 1108 1312 1604">  </div> <p>Fuente: Autor</p> <p>La secuencia de puesta del huevo normalmente disminuye a medida que finaliza el período de producción del lote, se puede relacionar la baja incubabilidad con el incremento en la incidencia de primeros huevos de las secuencias de puesta en lotes que envejecen (Reijrink, et al; 2008).</p>

cuando se presentan condiciones de temperaturas mayores a 20°C en las bodegas de las granjas de reproductoras o hay recolectas de huevo infrecuentes el embrión se puede preincubar y llegar hasta el desarrollo de la línea primitiva (periodo de migración celular activa y diferenciación). El almacenamiento en este periodo podría impedir procesos embrionarios críticos. Por lo tanto, hay cierto punto de no retorno, alcanzado el cual el desarrollo embrionario ya no puede detenerse.

En la ovoposición, como se observa en la imagen 4, el embrión puede alcanzar el estado de pregastrula el cual soporta peor los periodos de almacenamiento prolongado en comparación con los embriones en estado de gástrula (Decuypere y Michels, 1992; Deijrink et al., 2008)

Imagen 4. diferentes estados de desarrollo después de la oviposición



Fuente: Adaptado de Decuypere y Michels, 1992.

Los cambios de dieta que influyen en el porcentaje de puesta provocan, indirectamente, un cambio inverso en la calidad interna del huevo

Almacenamiento

En huevos almacenados por más de 5 a 7 días (Mayes y Takeballi, 1984; Mauldin, 2002; Fassenko, 2007); incluso a temperaturas más bajas de 13 ° C (55.4 ° F) se puede disminuir la tasa de eclosión y presentar daño por blastodermo (Mather y Laughlin, 1979) que conduce a una mortalidad embrionaria temprana (Mayes y Takeballi, 1984).

En periodos de almacenamiento mayores a 7 días a temperaturas de 18°C se presenta un rápido decrecimiento en la calidad interna del huevo (Van den Brand et al., 2008) y transformaciones de la albumina densa a líquida, este cambio posiblemente involucra al H₂CO₃, uno de los componentes del sistema búfer del albumen, el cual es disociado en agua y CO₂(Oliveira et al., 2009), incrementando las pérdidas de humedad y de dióxido de carbono (CO₂), que conllevan a la alcalinización del huevo (Brake et al., 1997; Davis and Reeves, 2002; Quality egg guide, 2007), y disminuyen la viscosidad de la albúmina (Jeffrey, 2007; Hassan et al., 2005; Hasler, 2000).

	<p>La albúmina de un huevo recién puesto tiene un pH de aproximadamente 7.6 pero puede aumentar a 9 o más con el almacenamiento (Keener et al., 2000). La albúmina gruesa y delgada no solo se vuelven menos viscosas, sino que las chalazas, uno de los componentes de la albúmina que centra la yema en el interior del huevo, se deteriora con el almacenamiento prolongado (Fromm, 1967). La membrana vitelina de la yema se debilita, perdiendo su elasticidad, permitiendo que el agua se difunda en la yema desde la albúmina, aplanando la yema y haciendo que la membrana sea más propensa a la ruptura (Zeidler, 2002b; Jones y Musgrove, 2005). Además la yema gira y flota muy cerca de la parte superior del huevo, de modo que el embrión se sitúa cerca a la membrana interior de la cascara exponiéndose a la deshidratación y contaminación.</p> <p>A nivel celular, Arora y Kosin (1968) concluyeron que el número de núcleos necróticos en células de embriones de los huevos almacenados aumentó a medida que la duración del almacenamiento se prolongaba. La reducción en células sanas puede ser la razón detrás de las observaciones de Mather y Laughlin (1979), quienes observaron que cuando se almacenan los huevos, el área de blastodermo se reduce. Más recientemente, Bloom et al. (1998) demostraron que hay un aumento en el número de células que están programadas para morir (células apoptóticas) cuando se almacenan los huevos por 14 días.</p> <p>La manipulación inadecuada del huevo genera que el blastodermo se mueva por una rotura de la chalaza y cambie la posición de la yema y blastodermo, ocasionando MET (Peebles <i>et al</i>; 1987; Vick, <i>et al</i>; 1993; Ulmer-Franco, <i>et al</i>, 2010)</p>
<p>Incubación</p>	<p>La mortalidad en este período, que ocurre durante las primeras 25 h de desarrollo embrionario (y durante el almacenamiento), podría ser la base biológica para una fase adicional de aumento de la mortalidad (Munro y Kosin, 1945). Esta tiene una tendencia a ser mayor entre 3-5 días, a causa del cambio en la eliminación del CO₂, además los CHOS son la fuente principal de energía del embrión en esta etapa y el CO₂ (producido durante el catabolismo de los CHOS) se puede acumular en concentraciones que pueden resultar fatales (Romanoff, 1949).</p> <p>Durante los días 3-5 se forman vasos sanguíneos extraembrionarios omfalo-mesentéricos que sirven a los tejidos que se desarrollan en las membranas extraembrionarias (transporte de yema parcialmente digerida) y se fusionan las membranas alantoides - Corión su función es el intercambio O₂, transporte de Ca y almacenamiento de N) (Ausprunk et al., 1974) estas membranas son extremadamente sensibles a modificaciones ambientales aumentando la tasa de MET. (Hambuerguer, 1947).</p> <p>El pH de la albúmina alcanza su punto más alto en 2 a 3 días de incubación mediante la liberación de CO₂ de la albúmina, y luego, el pH disminuye</p>

	<p>gradualmente y se vuelve más ácido durante la incubación (Tona et al., 2007; Fang et al., 2012) La asimetría en el pH entre la yema y la albúmina establecida por el aumento del pH de la albúmina puede desempeñar un papel en la determinación de la viabilidad del embrión y la formación de líquido sub-embriionario durante el desarrollo embrionario temprano (Benton y Brake, 1996); por lo tanto una mayor concentración de CO₂ durante los primeros 3 días de incubación altera el pH de la albúmina y reduce la incubabilidad fértil debido al aumento de la mortalidad embrionaria temprana (Özlu, 2019).</p>
--	---

Tabla 9. Factores asociados a pérdidas de incubabilidad por mortalidad intermedia

Factores asociados a pérdidas de incubabilidad	
Lugar	Mortalidad intermedia
Granja	Debido a que la edad de la reproductora, la incubabilidad y la calidad de cascara tienen una correlación negativa (Peebles et al., 2000) el riesgo de contaminación horizontal asociado a al grosor de la cascara y la porosidad, esto ocasiona un aumento la tasa de MET y MEI, asociado a la degradación de la albumina (la yema gira y flota muy cerca de la parte superior del huevo, de modo que el embrión se sitúa cerca a la membrana interior de la cascara exponiéndose a contaminación bacteriana generando ME) (Alda, 2003).
Almacenamiento	El periodo de almacenamiento mayor a 7 días aumenta la perdida de H ₂ O, aproximadamente 0,5% por semana, disminuyendo el 2% la incubabilidad por cada día adicional de almacenamiento después de los 5 días, además se genera adherencia del embrión a la cámara de aire debido a la degradación de la albumina
Incubación	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 los nutrientes se movilizan activamente desde la albumina y progresivamente desde el vitelo (Bellairs, 2014). Por estos motivos, suministrar una dieta balanceada a los lotes es vital para transferir al huevo los elementos necesarios para el desarrollo del embrión y por lo mismo, excesos o deficiencias de ciertos nutrientes incidirán en la mortalidad durante la segunda semana de incubación (Peñuela, 2017).

Tabla 10. Factores asociados a pérdidas de incubabilidad por mortalidad tardía

Factores asociados a pérdidas de incubabilidad	
Lugar	Mortalidad Tardía

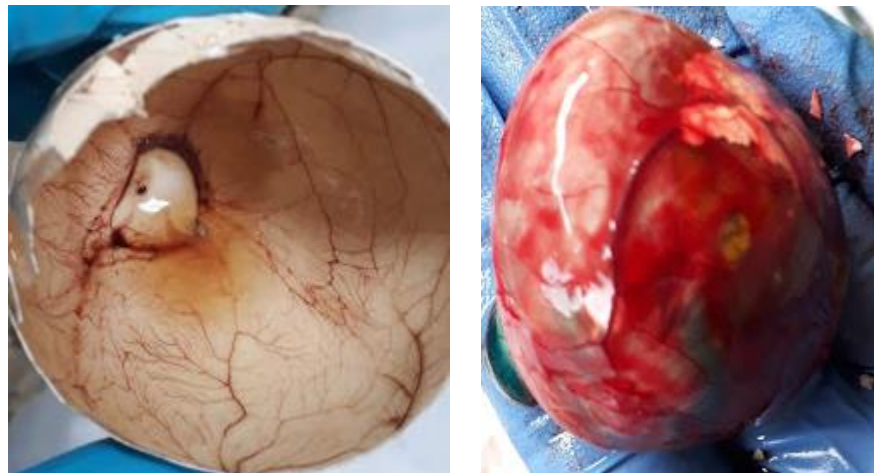
<p>Granja</p>	<p>Los problemas en la calidad de la cascara están asociados a un mayor porcentaje de pérdida de humedad del huevo durante la incubación (Reis et al., 1997 ; Peebles et al., 2001) y baja capacidad de eclosión (Narushin y Romanov, 2002), a medida que las gallinas envejecen, el peso del huevo aumenta, el grosor de la cáscara disminuye (Peebles et al., 2000) y la proporción de yema aumenta a expensas de la albúmina y la cáscara del huevo (Suarez et al., 1997).</p>
<p>Almacenamiento</p>	<p>El almacenamiento prolongado (14 días) del huevo incubable aumenta el tiempo de incubación ya que añade de 10 a 12 horas al periodo total de incubación, además de mostrar baja incubabilidad, una ventana de nacimientos más amplia, pollitos rezagados en su nacimiento y un mayor porcentaje de pollitos de segunda calidad. (Mather y Laughlin, 1979) lo que puede explicar el aumento en el índice de mortalidad tardía (picados vivos) y embriones vivos con edad fisiológica de 20 días.</p> <p>Los embriones de huevos almacenados durante 14 días dependen más de la gluconeogénesis durante el picaje y la eclosión que los embriones de los huevos almacenados 4 días, aumentando la tasa de mortalidad tardía (Christensen y col, 2001).</p>
<p>Incubación</p>	<p>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 completa (Payne, 1919) y cualquier falla en esta transición puede interferir con la eclosión exitosa del embrión (Romanof, 1949)</p> <p>La MTa puede estar relacionada al cambio en la utilización de los nutrientes, el embrión los obtenía principalmente de la albumina y después del día 16 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 abdominal (Kuurman, 2003) y esto puede alterar la viabilidad del embrión.</p> <p>Schmidt en el 2009 reportó que el tamaño del huevo está correlacionado con la edad de las reproductoras y el tamaño del embrión, el incremento de ME asociado a huevos grandes, especialmente la METa está asociada a la dificultad del embrión para perder calor metabólico durante las últimas etapas de la incubación (Elibol, 2008).</p> <p>El efecto de la temperatura de incubación sobre la incubabilidad del huevo y la calidad de la eclosión puede estar relacionado con su influencia en la duración de la incubación y la pérdida de agua durante la incubación. Sin embargo, tales efectos dependen de cuánto tiempo y cuán intenso sea el cambio desde la temperatura óptima. De acuerdo con Givisiez et al. (2000) un aumento de 1°C (38.8°C) por encima de la temperatura óptima de incubación</p>

(37.8°C) a partir del día 13 de incubación provoca una reducción significativa de la tasa de eclosión de los huevos de engorde.

El rango normal de pérdida de humedad durante la incubación es del 12 al 14% en pollos de engorde al día 18 de incubación. Sin embargo, una pérdida de agua por fuera de este parámetro influye en el desarrollo embrionario y, en consecuencia, en su incubabilidad (Nakage, et al, 2003). Las temperaturas de incubación superiores a las óptimas provocan una pérdida excesiva de agua del huevo (superior al 14%), lo que lleva a la mortalidad del embrión por deshidratación. Por otro lado, las temperaturas por debajo de la capacidad de eclosión óptima disminuyen debido a la pérdida de agua reducida (<12%), lo que provoca una sobrehidratación del embrión y un deterioro del intercambio de gases (Romanoff, 1930).

El impacto de ángulos de volteo moderadamente sub óptimos en los nacimientos pueden ser sutiles, pero incluyen niveles aumentados de embriones muertos prematura y tardíamente; cuando los ángulos de volteo fallan en la primera fase de desarrollo, la membrana corioalantoidea no se distribuye uniformemente como se observa en la imagen 5; aumentando la incidencia de mal posiciones específicamente cabeza orientada al polo agudo del huevo y cabeza debajo del ala izquierda.

Imagen 5. Membrana corioalantoidea



Fuente: Autor

7. Conclusiones

La aplicación de la embriodiagnosia como prueba diagnóstica permite identificar y cuantificar la distribución de las pérdidas de incubabilidad por fase de desarrollo embrionario además establecer antecedentes y evaluar la tendencia del proceso de incubación comparado con los estándares de la línea genética; además al definir el comportamiento de la mortalidad embrionaria, se tiene una base para medir el comportamiento de un parámetro clave en incubación y ejercer control ante la evidencia

de patrones anormales y condiciones adversas que puedan alterar cada una de las etapas de desarrollo.



Existen condiciones de incubación propias de cada empresa que pueden alterar el comportamiento de la curva de mortalidad, aunque se conserve una tendencia propia de los mecanismos biológicos inherentes al embrión de pollo, por tal motivo la implementación de pruebas diagnósticas permite analizar de forma oportuna las causas de muerte embrionaria con el fin de discernir si es un problema operativo o del lote de reproductoras.

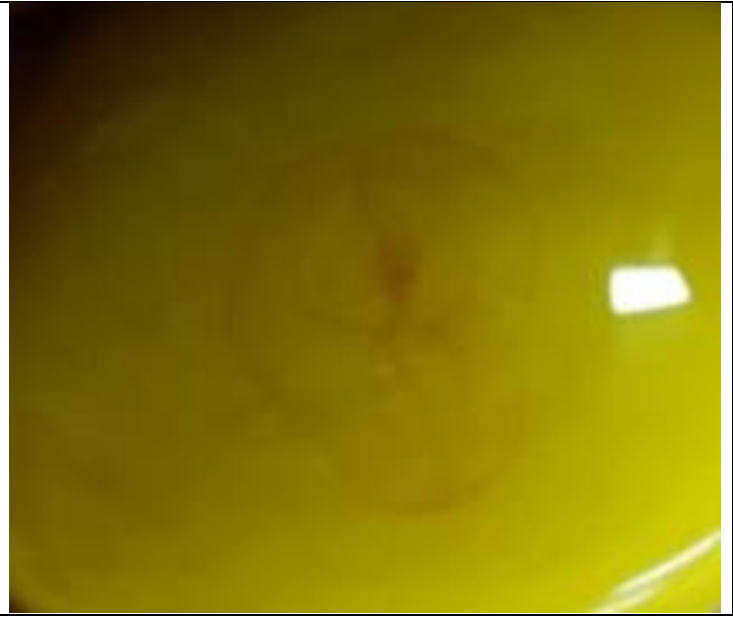
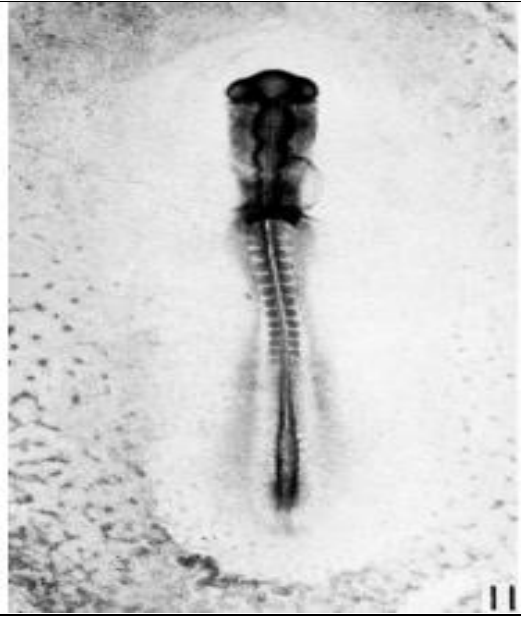
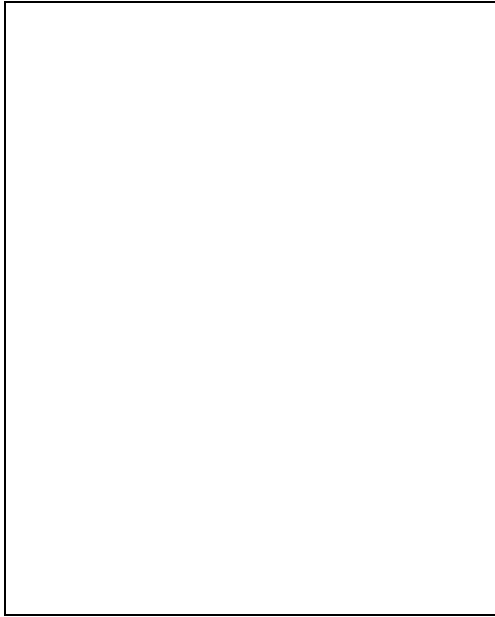
Anexos

Tabla 1. Desarrollo embrionario tabla normal (Hamburger y Hamilton 1951) Vs ovoscopia

DESARROLLO EMBRIONARIO TABLA NORMAL (Hamburger y Hamilton 1951) Vs OVOSCOPIA

Los embriólogos siempre han considerado conveniente clasificar el crecimiento embrionario en una serie de etapas de desarrollo, tal clasificación se llama una tabla normal la más utilizada para las aves domésticas es la elaborada por Hamburger y Hamilton 1951, está clasificación se basa exclusivamente en características externas, a continuación se presenta una comparación del desarrollo embrionario tabla normal Vs ovoscopia y embriodiagnos, cada etapa es ilustrada por una fotografía y acompañado por una breve descripción.

Descripción	Tabla normal (Hamburger y Hamilton 1951)	Ovoscopía
<p>24 horas 48 horas</p> <p>Desarrollo de área pelúcida y área opaca del blastodermo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 24 horas: Membranas extraembrionarias color crema ocupando un área ≈1cm • 48 horas: Membranas extraembrionarias color crema ocupando un área ≈3cm, cambios en la coloración de la albumina, Se aprecia muy bien la formación de los vasos sanguíneos sobre el saco vitelino, el embrión comienza a girar hacia el lado izquierdo. <p>Imagen 6, etapa 7, embrión de 23-26 horas, Se observa línea primitiva, nódulo de Hensen visible, el área pelúcida tiene forma de pera y comienza el proceso de la cabeza.</p> <p>Imagen 7, etapa 11, embrión con 40 - 44 horas, el corazón tiene una ligera forma de S, el pliegue de amnios cubre toda la región del cerebro anterior, se está desarrollando el sistema circulatorio y aparecen primordios de hígado.</p>	<p>Imagen 6. Etapa 7 Fuente: Hamburger y Hamilton 1951</p>  <p>Imagen 7. Etapa 11 Fuente: Hamburger y Hamilton 1951</p>	<p>Imagen 26. Embrión 24 horas Fuente: Autor</p>  <p>Imagen 27. Embrión 44 horas Fuente: Autor</p>



3 - 4 días

- Flexión cráneo caudal es más profunda, se forman los arcos aórticos y la torsión del corazón sobre sí mismo, los vasos sanguíneos y el órgano pulsátil, se observan fácilmente.
- El ala y las yemas de las piernas son más largas que anchas, no hay demarcación de los dígitos.
- fusión de las membranas corión y alantoides
- se forman vasos sanguíneos extraembrionarios omfalo-mesentéricos que sirven a los tejidos que se desarrollan en las membranas extraembrionarias (transporte de yema parcialmente digerida) y se fusionan las membranas alantoides - Corión (intercambio O₂, transporte de Ca y almacenamiento de N) (Ausprunk et al., 1974)

Imagen 8. Etapa 20 (70-72 horas)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951



Imagen 9. Etapa 23 (4 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951

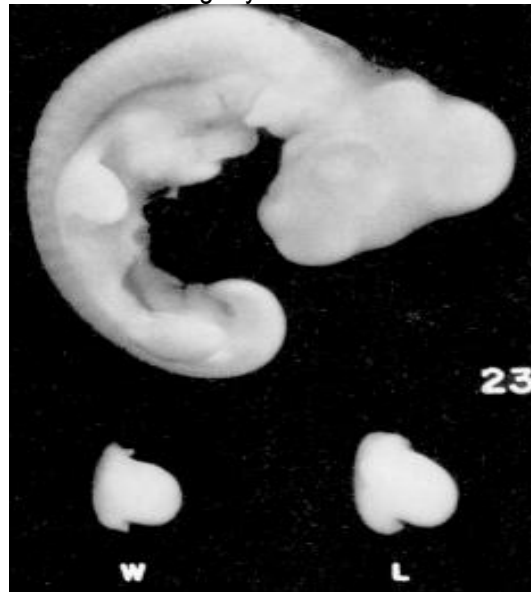


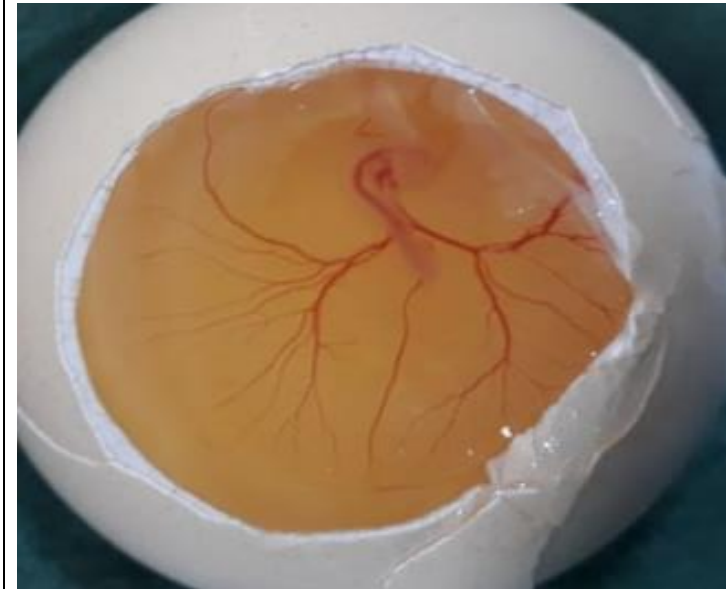
Imagen 28. Embrión 72 horas

Fuente: Autor



Imagen 29. Embrión 4 días

Fuente: Autor



5 - 6 días

- Extremidades más largas, el contorno de la placa digital es redondeado y la demarcación de los tres primeros dedos se puede distinguir.
- Curvatura cefálica evidente
- Pigmentación del ojo (ojo negro) observable a simple vista.
- Primeros movimientos activos del tronco
- bolsa de Fabricio comienza a diferenciarse
- Inicia la formación del pico (día 6) crecimiento distintivo es visible en el perfil.
- Se hace visible el meato auditivo externo

Imagen 10. Etapa 26 (6 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951

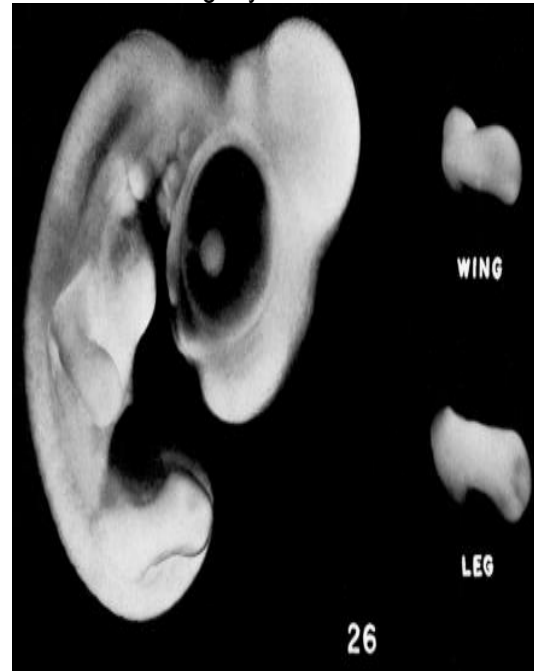


Imagen 11. Etapa 29 (6 - 6,5 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951

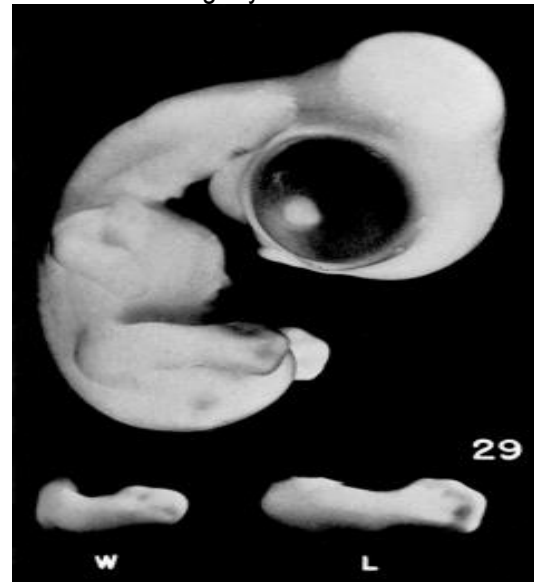


Imagen 30. Embrión 5 días

Fuente: Autor



Imagen 31. Embrión 6 días

Fuente: Autor



7 días

- Ala doblada en el codo y pierna.
- Surcos distintivos entre el primero y el segundo dígito.
- Cuello alargado.
- Diente de huevo: distintivo
- El embrión se encuentra a sobre la superficie del saco vitelino.
- Se observa muy bien la vascularización del vitelo,
- Diferenciación sexual.
- comienza La producción de testosterona en el macho.
- comienzan los movimientos del globo ocular.
- La tiroides es capaz de sintetizar monoyodotirosina.
- Comienza la mineralización del hueso.
- Desarrollo del conducto mulleriano derecho cesa en la hembra y ambos (izquierdo y derecho) en el macho.
- inicia la secreción de ACTH
- El amnios se visualiza como una estructura serosa transparente, que envuelve al embrión, el saco vitelino es un área ópticamente más densa y vascularizada, la alantoides es menos vascularizada y menos densa.

Imagen 12. Etapa 31 (7 - 7,5 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951

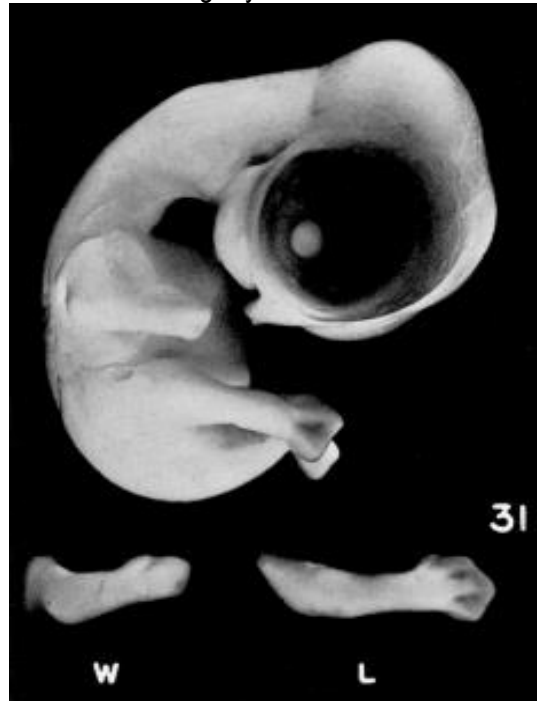


Imagen 32. Embrión 7 días

Fuente: Autor



Imagen 33. Embrión 7 días (acercamiento)

Fuente: Autor

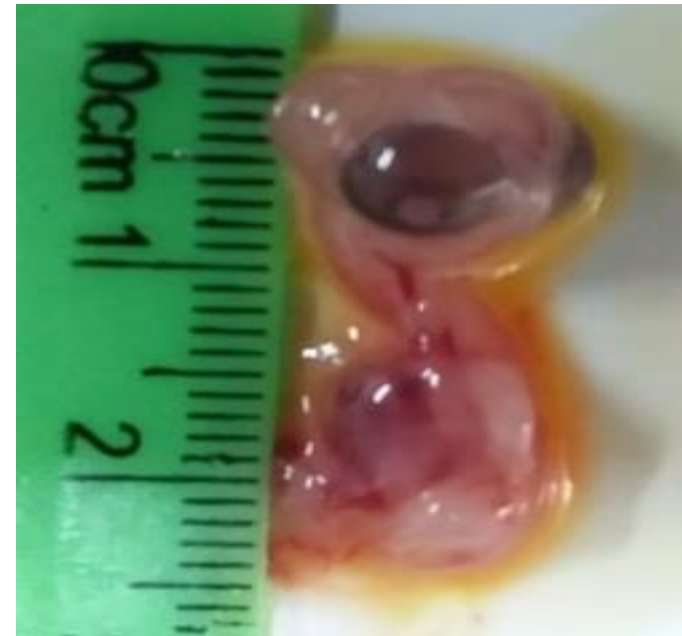


Imagen 34. Embrión 7 días (membranas extra embrionarias)

Fuente: Autor



8 - 9 días

- Tercer dedo del pie sobresale
- El tejido entre los dígitos es discreto
- Crecimiento acelerado del globo ocular
- Pico: alargado.
- La tiroides es capaz de sintetizar diyodotirosina.
- membrana corioalantoidea comienza a fijarse a la cascara
- actividad hematopoyética en la médula ósea
- El embrión se ubica lateralmente al vitelo, se notan los dedos y las patas (día 8)
- Son evidentes los folículos de las plumas.
- El embrión tiene forma de ave y se observa la abertura bucal (día 9).
- Papila escleral formó casi un círculo completo (Bellairs y Osmond, 2005).

Imagen 13. Etapa 34 (8 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951

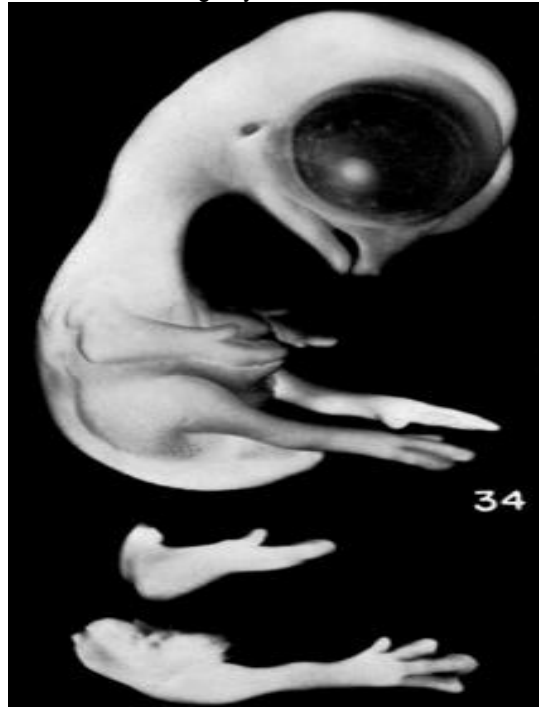


Imagen 14. Etapa 35 (8 - 9 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951

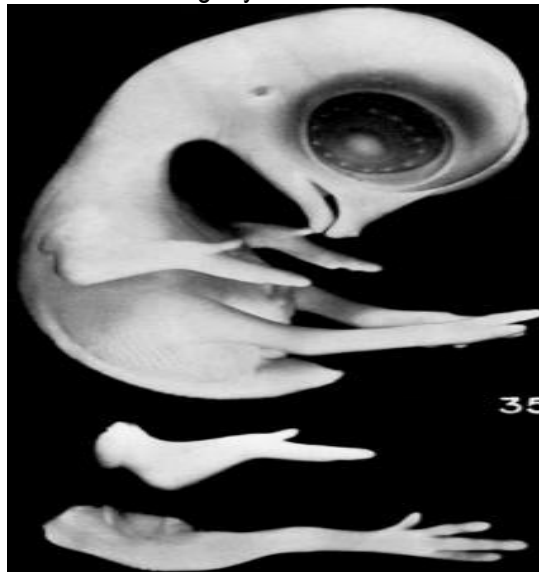


Imagen 35. Embrión 8 días

Fuente: Autor



Imagen 36. Embrión 9 días

Fuente: Autor



10 días

- El pico comienza a endurecerse en este momento el embrión está separado del saco vitelino, y flota libremente en el líquido amniótico.
- Se pueden observar los poros de la piel.
- Se consume la albúmina.
- Fosa nasal se ha reducido a una hendidura.
- el párpado inferior ha crecido hacia arriba hasta el nivel del
 - córnea
- Los movimientos de todo el cuerpo se vuelven bruscos y aleatorios.
- La tiroides secreta tiroxina; Comienza la secreción de TSH.
- La posición del embrión es fija en ángulo recto al eje largo del huevo.
- Primeros reflejos musculares propioceptivos locales.

Imagen 16 (a). Embrión de 10 días:

- 1 fosa nasal externa
- 2 futuro párpado
- 3 osículo escleral
- 4 oído externo
- 5 lente vista a través de la córnea

Imagen 16 (b) Embrión de 10 días:

- 6 primordios de las plumas
- 7 ombligo

Imagen 15. Etapa 36 (10 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951



Imagen 16. Embrión de 10 días

Fuente: Keibel 1900

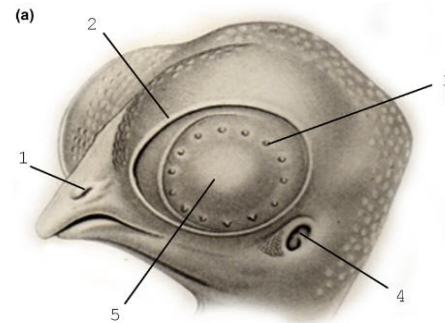


Imagen 37. Embrión 10 días

Fuente: Autor



Imagen 38. Embrión 10 días (membranas extra embrionarias)

Fuente: Autor

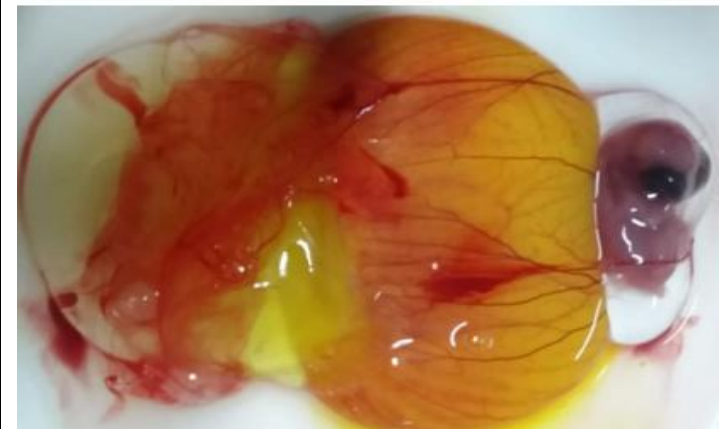
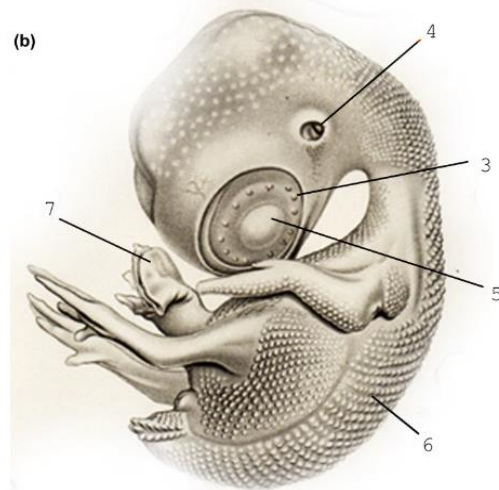


Imagen 39. Embrión 10 días (acercamiento)

Fuente: Autor



11 días

Extremidades: las garras de los dedos de los pies se aplanan lateralmente y curvada ventralmente.

- Almohadillas en la superficie plantar del pie.
- Longitud del tercer dedo del pie = 7.4 ± 0.3 mm.
- Párpados: la parte inferior cubre de un tercio a la mitad de la Córnea, el párpado superior ha alcanzado el borde dorsal de la córnea
- Metanefros comienzan a funcionar.

Imagen 17. Etapa 37 (11 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951

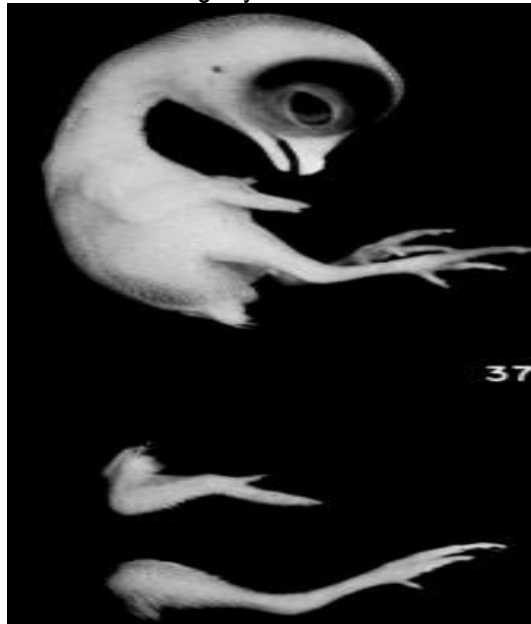


Imagen 40. Embrión 11 días

Fuente: Autor



12 -13 días

primordios de escamas visibles como crestas sobre la superficie de la pata

- Longitud del tercer dedo del pie = 8.4 ± 0.3 mm.
- El esternón, cuello y alas están cubiertos de plumón
- El párpado inferior cubre de dos tercios a tres cuartos de la córnea
- Empieza la absorción de albúmina.
- Mesonefros degenerados
- Los conductos müllerianos se pierden en el macho
- Comienza la absorción de calcio de la cáscara
- Longitud del tercer dedo del pie = 9.8 ± 0.3 mm
- La abertura entre los párpados se reduce a una capa delgada y creciente.
- Aumento del transporte de lípidos por saco vitelino.
- El eje pituitario-gónada es establecido definitivamente.
- La neurohipófisis se vuelve activa.
- Células de la glándula del proventrículo comienzan la secreción.
- Escamas de las patas visibles
- Las etapas 14 -18 días se basan principalmente en la longitud del pico y en la longitud del tercer dedo del pie (el más largo), dado que otras características externas han perdido su valor diagnóstico.

Imagen 18. Etapa 38 (12 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951



Imagen 19. Etapa 39 (13 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951



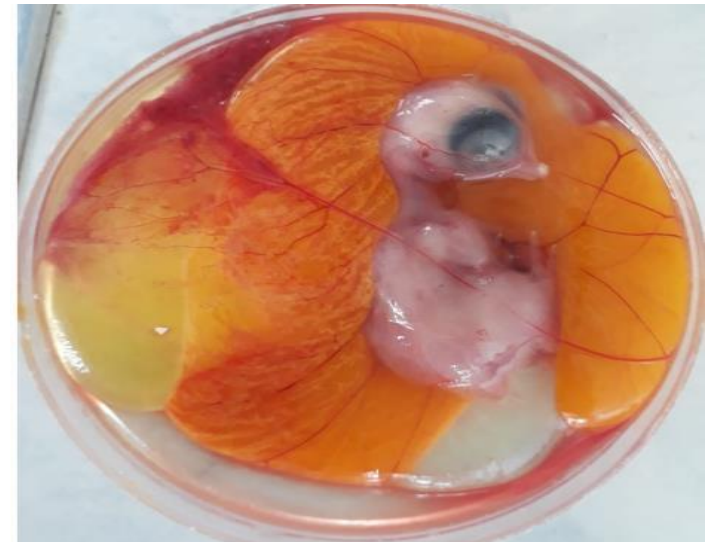
Imagen 41. Embrión 12 días

Fuente: Autor



Imagen 42. Embrión 12 días (membranas extra embrionarias)

Fuente: Autor



14 días

Las proporciones corporales son las características de un pollo.

- El embrión efectúa una rotación y altera su posición con relación al eje longitudinal del huevo.
- La cabeza gira en dirección de la cámara de aire. el pico aparece con la punta córnea hacia el polo superior del huevo.
- Embrión cubierto completamente de plumón
- Longitud del pico desde el borde anterior de la fosa nasal hasta la punta = 4,0 mm.
- Longitud del tercer dedo del pie = 12.7 ± 0.5 mm.
- El páncreas exocrino comienza la maduración
- Sensibilidad máxima a 400 Hz.
- Actividad eléctrica esporádica en el cerebro.

Imagen 20. Etapa 40 (14 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951

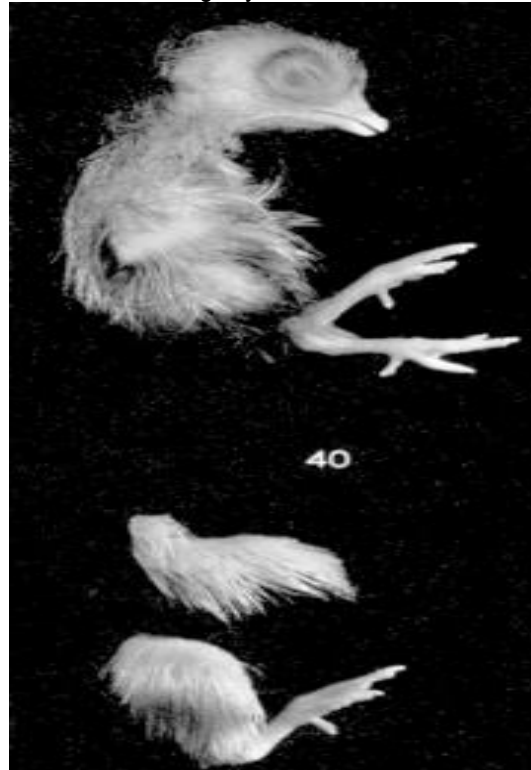


Imagen 43. Embrión 14 días

Fuente: Autor



15 días

La albúmina ha desaparecido en su totalidad.

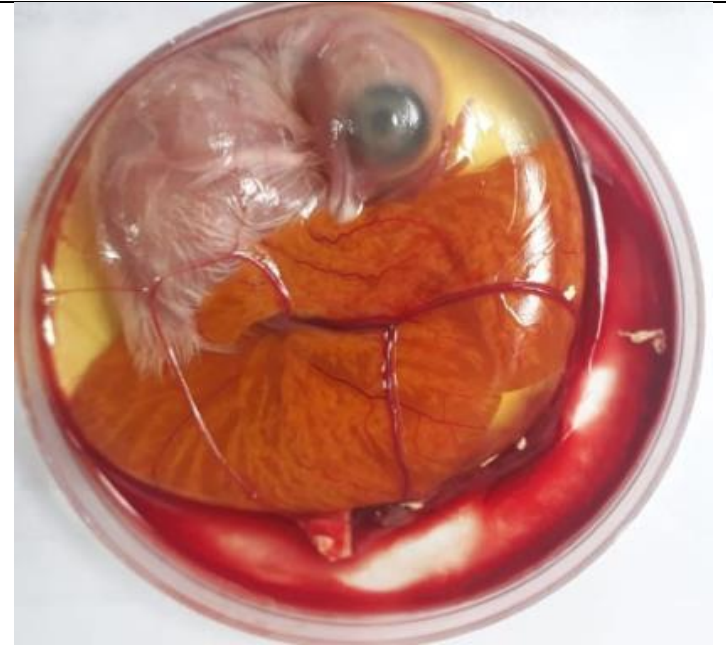
- El intestino comienza a penetrar al interior de la cavidad abdominal.
- Longitud del pico desde el ángulo anterior de la fosa nasal hasta la punta del pico superior = 4,5 mm.
- Longitud del tercer dedo del pie = 14.9 ± 0.8 mm.
- El estómago comienza a contraerse.

Imagen 21. Etapa 41 (15 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951

Imagen 44. Embrión 15 días

Fuente: Autor



16 días

• Cambio en la utilización de los nutrientes, el embrión los obtenía principalmente de la albumina y después del día 16 empieza a depender de la yema

• En el saco alantoideo aparece un cúmulo de material oscuro, producto de las excreciones del metabolismo del embrión

• Longitud del pico desde el ángulo anterior de la fosa nasal hasta la punta del pico superior = 4,8 mm.

• Longitud del tercer dedo del pie = 16.7 ± 0.8 mm.

• Embrión capaz de efectuar movimientos respiratorios.

Imagen 22. Etapa 42 (16 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951

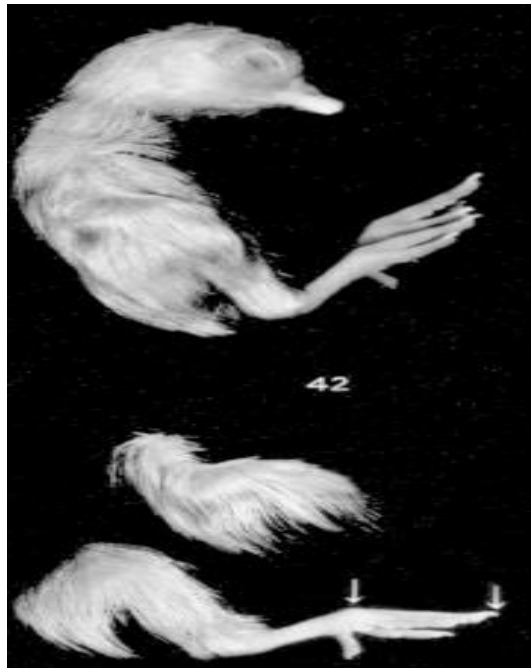


Imagen 45. Embrión 16 días

Fuente: Autor



17 días

Longitud del pico desde el ángulo anterior de la fosa nasal hasta

- Punta del pico superior = 5.0 mm.
- Longitud del tercer dedo del pie = 18.6 ± 0.8 mm.
- Comienzan los movimientos coordinados y estereotipados.
- El embrión ha absorbido todo el líquido amniótico y alantoideo.
- El embrión empieza a tomar posición normal para nacer, girando la cabeza hacia el ala derecha

Imagen 23. Etapa 43 (17 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951



Imagen 46. Embrión 17 días

Fuente: Autor



18 días

• Comienza la absorción de la yema, junto con la entrada del saco vitelino en la cavidad abdominal.

- Longitud del pico desde el ángulo anterior de la fosa nasal hasta la punta del pico superior = 5,7 mm.
- Longitud del tercer dedo del pie = 20.4 ± 0.8 mm.
- El pico se mete debajo del ala derecha; máximo
- La sensibilidad al sonido se eleva a 800 Hz.

Imagen 24. Etapa 44 (18 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951

Imagen 47. Embrión 18 días

Fuente: Autor

- Duodeno inicia la maduración
- comienza la secreción de calcitonina.
- Primeras respuestas de comportamiento a la luz.



19 días

- 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 completa (Payne, 1919).
- Se rompe el alantoides, como consecuencia aumenta la concentración de dióxido de carbono, siendo el estímulo para el comienzo de la respiración pulmonar.
- hacia el día 19 la yema no se ha absorbido, pero se encuentra en el proceso de pasar dentro de la cavidad abdominal (Kuurman, 2003)
- La longitud del pico ya no es diagnóstica debido a reducción en la longitud por desprendimiento del peridermo, pero ahora es brillante.

Imagen 25. Etapa 45 (19 - 20 días)

Fuente: Hamburger y Hamilton 1951






Imagen 48. Embrión 19 días

Fuente: Autor



<ul style="list-style-type: none"> • Se completa la absorción del fluido alantoico • Ectodermo coriolantoico degenerado; Se reduce la circulación corioalantoica. • Absorción del saco vitelino se completa. • Tiendas de glucógeno hepático son movilizados • Los reflejos posturales están completamente desarrollados. • En el día 20 el saco vitelino está totalmente incorporado a la cavidad abdominal y comienza la cicatrización del ombligo. • Picaje externo, en forma rotativa y en sentido inverso a las agujas del reloj. 		
---	--	--

Tabla 2. Características externas del embrión para clasificación de mortalidad embrionaria por medio de embriodiagnos

Embriodiagnos	
<p>Infertil</p> <p>Reconocimiento del blastodisco, forma irregular y tamaño \approx 2 mm, albumina sin cambios evidentes de coloración</p>	<p>Imagen 49. Huevo infertil Fuente: Autor</p> 
<p>1-2 días</p> <p>Membranas extraembrionarias color crema ocupando un a área \approx3cm, se observan cambios en la coloración de la albumina.</p>	<p>Imagen 50. Huevo fertil (mortalidad embrionaria 1 - 2 días) Fuente: Autor</p> 
<p>3-4 días</p> <p>indicios de fluido sub-embionario, en el día 4 se observa el embrión</p>	<p>Imagen 51. Mortalidad embrionaria 3 - 4 días) Fuente: Autor</p> 
<p>5-7 días</p> <p>Los embriones muertos en la fase de anillo de sangre generalmente, no presentan indicio alguno de sangre. Sin embargo, tanto los residuos de las membranas extraembrionarias de color crema, como la bolsa amniótica que produce la zona clara por</p>	<p>Imagen 52. Mortalidad embrionaria 5 días Fuente: Autor</p>

encima de la yema, son rasgos característicos de la muerte en esta fase.

Se logra identificar el ojo (pigmentación del ojo) las alas y las piernas.

En los embriones de 7 días es evidente el diente de huevo y la curvatura cefálica



Imagen 53. Mortalidad embrionaria 6 días

Fuente: Autor

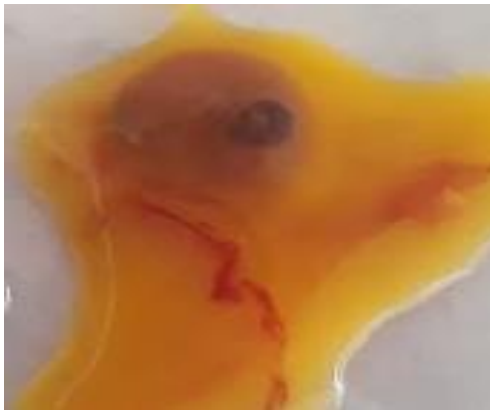


Imagen 54. Mortalidad embrionaria 7 días

Fuente: Autor



8-11 días

El embrión tiene forma de ave y se observa la abertura bucal y los folículos de las plumas; la pàpila escleral ha formado un circulo completo.

Imagen 55. Mortalidad embrionaria 8 días

Fuente: Autor

Al día 11 la parte inferior del párpado ha cubierto de un tercio a la mitad de la córnea, el párpado superior ha alcanzado el borde dorsal de la córnea, como se observa en la imagen 57.



Imagen 56. Mortalidad embrionaria 10 días

Fuente: Autor



Imagen 57. Mortalidad embrionaria 11 días

Fuente: Autor



Imagen 58. Mortalidad embrionaria 12 días

Fuente: Autor

12-14 días

Se observan los primordios de las escamas en las patas, el párpado inferior cubre de dos

tercios a tres cuartos de la córnea como se evidencia en la imagen 59.

En el día 14 el embrión ya está vestido completamente de plumón como se observa en la imagen 60.



Imagen 59. Mortalidad embrionaria 13 días

Fuente: Autor



Imagen 60. Mortalidad embrionaria 14 días

Fuente: Autor



Imagen 61. Mortalidad embrionaria 16 días

Fuente: Autor

15-17 días

Aún se observa el intestino, no ha ingresado en su totalidad a la cavidad abdominal



Imagen 62. Mortalidad embrionaria 17 días

Fuente: Autor



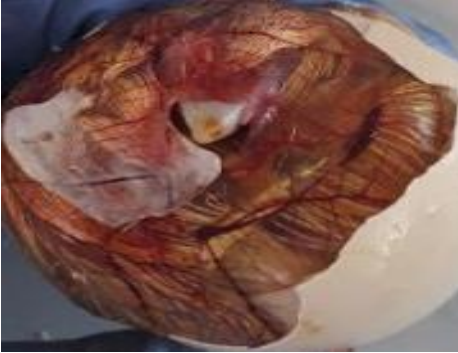

18-19 días

En el día 18 inicia la retracción del saco vitelino en la cavidad abdominal

Imagen 63. Mortalidad embrionaria 19,5 días

Fuente: Autor



	
<p>20-21 días</p> <p>En el día 20 el saco vitelino ya está totalmente incorporado a la cavidad abdominal y ha comenzado la cicatrización del ombligo</p>	<p>Imagen 64. Mortalidad embrionaria 20 días Fuente: Autor</p> 

8. Referencias bibliográficas

- A.G. Karaca, H.M. Parker, J.B. Yeatman, C.D. McDaniel The effects of heat stress and sperm quality classification on broiler breeder male fertility and semen ion concentrations, Br. Poult. Sci., 44 (2002), pp. 621-628
- Ausprunk, D.H., Knighton, D.R., Folkman, J., 1974. Differentiation of vascular endothelium the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. Dev. Biol. 38, 237
- BARBOSA VM, Rocha JSR, Pompeu MA, Martins NRS, Baiã NC, Lara LJC, Batista JVMSP, Leite RC. 2012. The effects of relative humidity and turning in incubators machines on the incubation yield and chick performance. World's Poultry Science Journal: 69; 89-98. ISSN: 0043-9339 DOI: <https://doi.org/10.1017/S0043933913000081>.
- Bellairs R, Osmond M. Endocrine glands. In: Bellairs R, Osmond M (eds.). Atlas of Chick Development. 3th edition. United Kingdom: Elsevier Academic Press, 2014; 111-113.
- Bellairs. R and M. Osmond. 2005. The Atlas of Chick Development. Second edition, Elsevier publication, California.

- DECUYPERE E, Michels H. 1992. Incubation temperature as a management tool: a review. *World's Poultry Science Journal*. 48:28-38. ISSN: 0043-9339. DOI: <https://doi.org/10.1079/WPS19920004>
- 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):1913–1918.
- Espinoza-Gutierrez, L. F., & Matey-Lechado, M. (2010). Evaluación de los factores del proceso de incubación que intervienen en la ventana de nacimiento de 39 Bibliografía los pollitos, en la incubadora PIPASA- Nicaragua, en el periodo de Enero a Julio, 2009. Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Agraria, Departamento de Medicina Veterinaria, Managua. Obtenido de <http://repositorio.una.edu.ni/1414/1/tnl01e77e.pdf>
- Fang J., Ma M., Jin Y., Qiu N., Huang Q., Sun S., Geng F.; Guo L. Liquefaction of albumen during the early incubational stages of the avian embryo and its impact on the antimicrobial activity of albumen *J. Food Agric. Environ.*, 10 (2012), pp. 423-427
- Givisiez PEN, Bruno LDG, Machado JRSA, Secato ER, Freitas D, Ribeiro LT, Macari M. Desempenho e resposta ao estresse calórico gradativo de frangos submetidos a estresse de calor e frio durante a incubação. *Revista Brasileira de Ciência Avícola (Suplemento)* 2000; 2:1.
- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*, 195(4), 231–272. doi:10.1002/aja.1001950404
- Hamburger, V., 1947. *A Manual of Experimental Embryology*. University of Chicago Press, Chicago, Ill.
- Jassim EW, Grossman M, Koops WJ, Luykx RAJ. Multiphasic analysis of embryonic mortality in chickens. *Poult Sci* 1996; 75(4):464–471.
- Jayachitra, S., K. Iniyah, K. Balasundaram and Amutha, R. 2017. Sequential Morphological Development of Chick Embryos on Namakkal Variety of Chicken. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 6(6): 2290-2293. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.606.271>
- K. Ashizawa, A. Fujiyama, Y. Tsuzuki Temperature dependent immobilization and restoration of fowl sperm motility caused by intracellular free calcium *Jpn. Poult. Sci.*, 36 (1999), pp. 9-18 google scholar
- Karaca, A. G., Parker, H. M., & McDaniel, C. D. (2002). Elevated body temperature directly contributes to heat stress infertility of broiler breeder males. *Poultry Science*, 81(12), 1892–1897. <https://doi.org/10.1093/ps/81.12.1892>
- Kuurman, W. W., Bailey, B. A., Koops, W. J., & Grossman, M. (2003). A model for failure of a chicken embryo to survive incubation. *Poultry Science*, 82(2), 214–222. <https://doi.org/10.1093/ps/82.2.214>
- Macari M., Gonzalez E., Sales Patricio I., Alencas Nääs I., Martins P. 2015. Manejo de la incubación. Capítulo: Embriodiagnóstico y patología perinatal. 3ed. FACTA (Brasil). 265
- Munro, S. S., and I. L. Kosin. 1945. Proof of the existence of pre- ovipositional embryonic deaths in chickens and their bearing on the relation between 'fertility' and hatchability. *Can. J. Res.* 23:129–138
- NAKAGE, ES et al. Effect of temperature on incubation period, embryonic mortality, hatch rate, egg water loss and partridge chick weight (*Rhynchotus rufescens*). *Rev. Bras. Cienc. Avic.* [online]. 2003, vol.5, n.2 [cited 2020-06-01], pp.131-135. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2003000200007&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1806-9061. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2003000200007>.

- Noiva, R., Menezes, A., & Peleteiro, M. (2014). Influence of temperature and humidity manipulation on chicken embryonic development. BMC Vet Res. doi:10.1186 / s12917-014-0234-3
- Özlü, S., Uçar, A., Banwell, R., & Elibol, O. (2019). The effect of increased concentration of carbon dioxide during the first 3 days of incubation on albumen characteristics, embryonic mortality and hatchability of broiler hatching eggs. Poultry Science, 98(2), 771–776. <https://doi.org/10.3382/ps/pey464>
- Payne LF. Distribution of mortality during the period of incubation. Poult Sci 1919; s2-6(2):9–12.
- Peebles. Doyle SM, Zuwalt CD, Gerard PD, Latour MA, Boyle CR, Smith TW. 2001. Breeder age influences embryogenesis in broiler eggs. Poultry Science. 80:272-277. ISSN: 0032-5791. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/80.3.272>.
- Plano, C; Di Maria; 2004. Atlas de la patología e incubación del pollo
- Reijrink IAM, Meijerhof R, Kemp B, Van Den Brand H, Arora KL, Kosin IL, et al. The chicken embryo and its micro environment during egg storage and early incubation. Worlds Poult Sci J 2008; 64(04):581–598.
- Reis, L., Gama, L., Chaveiro, T y Soares, M. 1997. Effects of short storage conditions and broiler breeder age on hatchability, hatching time and chick weights. Poultry Science Vol.76 (11) : 1457-1466.
- Romanoff AL. Critical periods and causes of death in avian embryonic development. The Auk 1949; 66(3):264–270.
- SUÁREZ ME, Wilson HR, Mather FB, Wilcox CJ, Mepheron BN. 1997. Effect of strain and age of the broiler breeder female on incubation time and chick weight. Poultry Science. 76:1029-1036. ISSN: 0032-5791. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/76.7.1029>.
- Tona K., Onagbesan O., Bruggeman V., De Smit L., Figueiredo D., Decuypere E. Non-ventilation during early incubation in combination with dexamethasone administration during late incubation: 1. Effects on physiological hormone levels, incubation duration and hatching events Domest. Anim. Endocrinol., 33 (2007), pp. 32-46
- VAN der Pol C., Roover-Reijrink van IAM, Maatjens CM, Brand van den H, Molenaar R. 2013. Effect of relative humidity during incubation at a set eggshell temperature and brooding temperature posthatch on embryonic mortality and chick quality. Poultry Science. 92:2145-2155. ISSN: 0032-5791. DOI: 10.3382/ps.2013-03006.