

Comportamiento productivo y calidad de huevo en gallinas de postura alimentadas con cuatro fuentes comerciales de fosfato inorgánico

Productive performance and egg quality in laying hens fed with four commercial sources of inorganic phosphate

Annie Salinas C.¹, Daniela Paredes M.¹, Luis Nakandakari A.^{1*}

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el comportamiento productivo de gallinas de postura comercial suplementadas con cuatro fuentes comerciales de fosfatos inorgánicos durante cuatro semanas. Se emplearon 960 gallinas Hy-Line Brown de 56 semanas de edad, distribuidas en 4 tratamientos con 6 repeticiones cada uno y 40 gallinas por repetición. Los tratamientos fueron: T1, Dieta con fosfato dicálcico (DCP)-Perú; T2, Dieta con DCP-China; T3, Dieta con fosfato mono-dicálcico (MDCP)-Perú y T4, Dieta con fosfato mono-cálcico (MCP)-China. Las dietas fueron formuladas para contener 0.36% de fósforo disponible y los demás nutrientes de acuerdo con las especificaciones nutricionales de la línea genética. Se registró el porcentaje de producción de huevo, masa de huevo, consumo de alimento y conversión alimenticia. Asimismo, el peso de huevo, porcentaje de cáscara, porcentaje de yema y albumen, grosor de cáscara, gravedad específica, color de cáscara, color de yema y Unidades Haugh (UH). No se encontraron diferencias significativa por efecto de la fuente de fósforo en el peso de huevo, color de cáscara y yema, mientras que el porcentaje de cáscara, grosor de cáscara, gravedad específica, UH y porcentaje de yema fueron afectados ($p < 0.05$) por los tratamientos dietarios. Se concluye que las fuentes de fosfato inorgánico evaluadas no tuvieron

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú
* E-mail: luis.nakandakari.a@upch.pe

Recibido: 18 de agosto de 2021

Aceptado para publicación: 12 de abril de 2022

Publicado: 28 de abril de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

efecto significativo sobre los parámetros productivos, y que los huevos de las gallinas suplementadas con el DCP-China presentaron una mayor gravedad específica en comparación a las otras fuentes de fosfato inorgánico.

Palabras clave: comportamiento productivo, fosfato Inorgánico, gallinas de postura, producción de huevos

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the productive performance of commercial laying hens supplemented with four commercial sources of inorganic phosphates for four weeks. In total, 960 Hy-Line Brown hens of 56 weeks of age were distributed in 4 treatments with 6 repetitions each and 40 hens per repetition. The treatments were: T1, Diet with dicalcium phosphate (DCP)-Peru; T2, Diet with DCP-China; T3, Diet with mono-dicalcium phosphate (MDCP)-Peru; and T4, Diet with monocalcium phosphate (MCP)-China. The diets were formulated to contain 0.36% available phosphorus and the other nutrients according to the nutritional specifications of the genetic line. The percentage of egg production, egg mass, feed consumption and feed conversion were recorded. Also, egg weight, eggshell percentage, yolk and albumen percentage, eggshell thickness, specific gravity, eggshell colour, yolk colour and Haugh Units (UH). No significant differences were found due to the effect of the phosphorus source on egg weight, eggshell and yolk colour, while eggshell percentage, eggshell thickness, specific gravity, HU and yolk percentage were affected ($p < 0.05$) for dietary treatments. It is concluded that the inorganic phosphate sources evaluated did not have a significant effect on the productive parameters, and that the eggs of the hens supplemented with DCP-China presented a higher specific gravity compared to the other sources of inorganic phosphate.

Key words: productive behaviour, inorganic phosphate, laying hens, egg production

INTRODUCCIÓN

Una parte del fósforo (P) requerido durante la formación del huevo se destina para la síntesis de la albúmina y la yema, procesos que son constantes durante el día, mientras que la formación de la cáscara comienza entre 4 a 5 horas después de la ovulación y tiene una duración de 18 a 20 horas (Roberts, 2004; Ketta y Tümová; 2016). Si bien la cáscara contiene una pequeña cantidad de P, aproximadamente 22 mg, este mineral juega un rol importante en su formación. Gran parte del calcio (Ca) requerido es movilizado de los huesos, sobre todo durante la noche

(Skøivan *et al.*, 2010; Jansen *et al.*, 2020). Luego de la ovoposición se debe reponer el Ca movilizado de los huesos, el cual es depositado junto al P formando los cristales de hidroxiapatita (Proszkowiec-Weglarz y Angel, 2013).

Las fuentes de P en el alimento de aves de postura comercial pueden ser de origen vegetal, animal o mineral. Entre 60 a 80% del P de los cereales (maíz, trigo, avena) y semillas de oleaginosas (soya, algodón, girasol) se encuentra formando un complejo de elevado peso molecular llamado fitato (inositol hexafosfato), elemento que las aves no lo pueden digerir debido a que la mucosa

intestinal no produce suficiente cantidad de la enzima fitasa (Li *et al.*, 2016a. Diversos estudios demuestran que la adición de fitasa en el alimento de gallinas de postura tiene un efecto directo al liberar parte del P unido al fitato (Kim *et al.*, 2017; Saleh *et al.*, 2021), pero aun así se requiere de la adición de una fuente inorgánica de P en el alimento para cubrir el requerimiento mínimo de 250 mg de P al día de gallinas en etapa productiva indicado por el National Research Council (NRC, 1994), aunque la guía de manejo de la línea genética Hy-Line Brown menciona un requerimiento diario de 400 mg de P (Hy-Line, 2018).

Las fuentes de fosfatos inorgánicos suelen presentar una alta disponibilidad, entre ellos el fosfato monocalcico (MCP), fosfato monodicalcico (MDCP), fosfato dicalcico (DCP) y sus combinaciones, que se obtienen mediante reacción de la roca fosfórica con un ácido fuerte para luego ser neutralizado con carbonato de calcio (Rodehutsord, 2011; Hamdi *et al.*, 2017). El nivel de aprovechamiento del P contenido en estas fuentes inorgánicas es variable y se determina por pruebas biológicas que permiten establecer la biodisponibilidad de P, el cual depende de numerosos factores, incluyendo la naturaleza de la roca inicial y el proceso de fabricación (Murga *et al.*, 2020).

En el mercado de insumos o aditivos nutricionales para aves se pueden encontrar diversos tipos de fosfatos inorgánicos de una gran variedad de países de origen, los cuales pueden variar en precio y calidad. Ante esto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el comportamiento productivo y calidad de huevo de aves de postura alimentadas con cuatro fuentes de fosfatos inorgánicos en la ración.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en las instalaciones de la empresa Agropecuaria Avícola Mesías S.R.L., granja avícola de postura comercial

ubicada en el distrito de Sunampe en Chincha, Lima (Perú), y tuvo una duración de cuatro semanas. Se utilizaron 960 gallinas de postura comercial de la línea genética Hy Line Brown, con 56 semanas de edad (segunda fase de postura), distribuidas en cuatro tratamientos con 6 repeticiones cada uno y 40 gallinas por repetición, bajo un diseño completamente aleatorizado.

Las aves fueron alojadas en jaulas de alambre galvanizado con rejilla que presentaban una pendiente del 5% para la recolección de huevos. Además, estaban equipadas con un comedero tipo canaleta lineal y el agua fue administrada por bebederos tipo niple. Se alojaron cinco gallinas por jaula con una densidad de 400 cm² por ave, donde cada ocho jaulas conformaron una unidad experimental.

Se evaluaron los siguientes tratamientos:

- T1, fosfato dicalcico (DCP) - Perú con 18.5% de P
- T2, fosfato dicalcico (DCP) - China con 18.0% de P
- T3, fosfato monodicalcico (MDCP) - Perú con 21.5% de P
- T4, fosfato monocalcico (MCP) - China con 22.3% de P.

Se formuló una dieta basal según los requerimientos nutricionales de la línea genética Hy Line Brown (Cuadro 1). La adición de las fuentes de fosfato inorgánico por tratamiento se realizó con base a la hoja técnica del producto comercial. En ningún caso se adicionaron enzimas exógenas. Las aves fueron alimentadas dos veces al día (05:00 y 15:00 h), la presentación del alimento fue en harina y el agua brindada fue limpia, fresca y administrada de forma *ad libitum*.

La recolección de huevos se realizó de forma diaria (07:00 y 14:00 h). El total de huevos recolectados al día determinó el porcentaje de producción y la masa de huevo (kg) (% de producción x peso de huevo). Además, se registró el consumo de alimento (kg) para calcular el índice de conversión de

Cuadro 1. Composición porcentual y valor nutricional calculado de las dietas experimentales

	Tratamiento*			
	T1	T2	T3	T4
Maíz	65.880	65.924	65.780	65.934
Torta de soya (46%)	19.800	20.000	19.800	20.000
Carbonato de calcio grueso	7.060	7.156	7.160	7.360
Carbonato de calcio fino	2.356	2.380	2.390	2.456
Subproducto de trigo	1.650	1.420	1.800	1.240
Fosfato inorgánico	1.376	1.250	1.200	1.140
Aceite acidulado de soya	1.000	1.000	1.000	1.000
Sal industrial	0.280	0.280	0.280	0.280
DL- Metionina 99%	0.200	0.200	0.200	0.200
Premezcla vitamínico-mineral	0.100	0.100	0.100	0.100
Secuestrante de micotoxinas	0.100	0.100	0.100	0.100
Bicarbonato de sodio	0.090	0.090	0.090	0.090
Promotor de crecimiento	0.100	0.100	0.100	0.100
Total	100.000	100.000	100.000	100.000
Valor nutricional calculado				
EM, kcal/kg	2700	2700	2700	2700
Proteína total, %	14.00	14.00	14.00	14.00
Lisina digestible, %	0.68	0.68	0.68	0.68
Met + Cist digestible, %	0.62	0.62	0.62	0.62
Treonina digestible, %	0.47	0.47	0.47	0.47
Calcio, %	4.00	4.00	4.00	4.00
Fósforo disponible, %	0.36	0.36	0.36	0.36
Sodio, %	0.18	0.18	0.18	0.18

T1: dieta basal + DCP-Perú; T2: dieta basal + DCP-China; T3: dieta basal + MDCP-Perú; T4: dieta basal + MCP-China

alimento (consumo de alimento, kg / masa de huevo, kg).

Con relación a la calidad de huevo, al término de la cuarta semana se tomó una muestra al azar de 15 huevos de primera o comerciales por repetición, para lo cual se consideró el criterio de diferencia de medias con un nivel de confianza del 95% y una potencia del 80%, y se realizaron las siguientes mediciones:

- Peso de huevo (g) por medio de una balanza digital gramera (± 0.01 g)
- Color de cáscara por medio del abanico colorimétrico Zinpro®
- Grosor de cáscara. Se midieron tres puntos con un vernier digital (los dos polos y la línea ecuatorial)

- Gravedad específica: 1.060, 1.065, 1.070, 1.075, 1.080, 1.085, 1.090
- Unidades Haugh (UH), mediante la fórmula de Haugh (Haugh, 1937) y la metodología de Eisen *et al.* (1962)
- Color de yema por medio del abanico colorimétrico DSM®
- Relación yema/albumen, expresado en porcentaje con relación al peso de huevo.

Los datos obtenidos se analizaron con el programa estadístico Minitab® 17. Para el caso de las variables paramétricas se determinó la normalidad y homogeneidad de varianza y luego se procedió con el análisis de varianza de una vía. En el caso de las mediciones no paramétricas, se empleó el análisis de Kruskal Wallis. La diferencia entre me-

Cuadro 2. Parámetros productivos en gallinas de postura alimentadas con cuatro fuentes comerciales de fósforo inorgánico¹

Variable	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
Producción de huevos, %	88.0	86.1	89.6	89.3
Masa de huevo, kg	0.056	0.055	0.057	0.057
Consumo de alimento, kg/d	0.117	0.115	0.116	0.117
Índice de conversión de alimento, kg/kg	2.089	2.091	2.035	2.052

T1: dieta basal + DCP-Perú; T2: dieta basal + DCP-China; T3: dieta basal + MDCP-Perú; T4: dieta basal + MCP-China

¹ Los valores son promedios de seis repeticiones de 40 aves (240 aves por tratamiento)

días se determinó por la prueba de Tukey, considerando un nivel de confianza de 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontró diferencia estadística por efecto de las fuentes de fosfato inorgánico sobre el desempeño productivo en gallinas de postura (Cuadro 2). En los cuadros 3 y 4 se observa que estas fuentes tampoco influyeron en forma significativa sobre el peso de huevo, color de cáscara, color de yema y porcentaje de albumen; sin embargo, en T3 se obtuvo un mayor porcentaje de cáscara, en T4 un mayor grosor de cáscara y en T2 una gravedad específica más elevada ($p < 0.05$) con respecto a los otros tratamientos (Cuadro 3). Por otro lado, con relación a la calidad interna de huevo, en T1 se obtuvo el valor más elevado a la evaluación de las unidades Haugh, así como el porcentaje de yema ($p < 0.05$) (Cuadro 4).

La falta de diferencia estadística por efecto de las fuentes comerciales de fosfato inorgánico sobre la performance productiva difiere con el estudio de Cotrina (2011) quien evaluó las fuentes DCP 18% de P y DCP 18.5% de P en el alimento de gallinas de postura de 32 semanas de edad durante ocho semanas, encontrando un mayor consumo de

alimento y masa de huevo a favor del DCP 18%, pero mejor conversión de alimento con DCP 18.5%. De igual forma, Said *et al.* (1984) encontraron en gallinas alimentadas con el DCP una mayor producción de huevos en comparación a los grupos suplementados con dos fuentes de roca fosfatada a un nivel de 0.5% de P total en el alimento, lo cual se atribuye a una mayor biodisponibilidad del P presente en el DCP. Según Li *et al.* (2016b), el nivel de P en el alimento tiene un efecto directo sobre la respuesta productiva de las aves, ya que en casos de deficiencia reduce el consumo de alimento y con ello la producción y calidad del huevo.

Los resultados de peso de huevo concuerdan con el estudio de Vandepopuliere y Lyons (1992), quienes no encontraron diferencia estadística a la evaluación del peso de huevo en gallinas de postura alimentadas con una fuente de DCP y otra de fosfato desfluorinado. No obstante, Cotrina (2011) concluyó que el peso de huevo de gallinas alimentadas con el DCP de 18% de P fue superior al de aquellas alimentadas con el DCP 18.5% de P. En el presente estudio, al no encontrar diferencia estadística por efecto de la fuente de fosfato inorgánico sobre el peso de huevo, las otras variables evaluadas de calidad de huevo no fueron favorecidas o perjudicadas.

Cuadro 3. Calidad externa de huevo en gallinas de postura alimentadas con cuatro fuentes comerciales de fósforo inorgánico

	Tratamiento*			
	T1	T2	T3	T4
Peso de huevo, kg ¹	0.064	0.064	0.064	0.065
Color de cáscara	6.50	6.40	6.55	6.54
Porcentaje de cáscara	12.62 ^{ab}	12.63 ^{ab}	12.81 ^a	12.46 ^b
Grosor de cáscara, mm	0.43 ^b	0.41 ^b	0.42 ^b	0.44 ^a
Gravedad específica	1.088 ^{ab}	1.090 ^a	1.087 ^b	1.089 ^{ab}

T1: dieta basal + DCP-Perú; T2: dieta basal + DCP-China; T3: dieta basal + MDCP-Perú; T4: dieta basal + MCP-China

¹ Los valores son promedios de seis repeticiones de 15 huevos (90 huevos por tratamiento)

^{a,b} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Cuadro 4. Calidad interna de huevo en gallinas de postura alimentadas con diferentes fuentes comerciales de fósforo inorgánico

	Tratamiento			
	T1	T2	T3	T4
Unidad Haugh ¹	91.50 ^a	88.79 ^{ab}	88.82 ^{ab}	87.95 ^b
Color de yema	6.87	7.07	6.89	6.97
Porcentaje de yema	27.00 ^a	26.83 ^{ab}	26.69 ^{ab}	26.14 ^b
Porcentaje de albumen	58.63	58.20	58.45	58.70

T1: dieta basal + DCP-Perú; T2: dieta basal + DCP-China; T3: dieta basal + MDCP-Perú; T4: dieta basal + MCP-China

¹ Los valores son promedios de seis repeticiones de 15 huevos (90 huevos por tratamiento)

^{a,b} Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

El porcentaje de cáscara, grosor de cáscara y gravedad específica permiten evaluar la calidad del cascarón, ya que tienen relación con su dureza (Ketta y Tümová, 2016; Kibala *et al.*, 2018). Cabe señalar que a diferencia del porcentaje y grosor de cáscara, la gravedad específica es un método económico, rápido, no requiere romper el huevo y refleja la dureza del cascarón al indicar la cantidad de cáscara con relación a otros componentes del huevo (Harms *et al.*, 1990; An *et al.*, 2016). Con respecto a la calidad interna de huevo, la unidad Haugh es un parámetro

de suma importancia porque refleja la calidad del albumen, indicador que disminuye conforme se degradan las proteínas de la clara (Keener *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2016b).

El color de cáscara y yema no fueron influenciadas por las fuentes de fosfato inorgánico, toda vez que el color de la cáscara está relacionada a la genética del ave, y la presencia de carotenoides en el alimento favorecen la coloración de la yema (Samiullah *et al.*, 2015; Wilson, 2017; Bryden *et al.*, 2021).

CONCLUSIONES

- Las fuentes comerciales de fosfato inorgánico empleadas en el presente estudio no tuvieron un efecto significativo sobre el comportamiento productivo en gallinas de postura.
- La inclusión del fosfato dicálcico DCP-China en la dieta gallinas de postura presentó una mayor gravedad específica de los huevos en comparación a las otras fuentes comerciales de fosfato inorgánico.

LITERATURA CITADA

1. **An SH, Kim DW, An BK. 2016.** Effects of dietary calcium levels on productive performance, eggshell quality and overall calcium status in aged laying hens. *Asian Austral J Anim* 29: 1477-1482. doi: 10.5713/ajas.15.0655
2. **Bryden W, Li X, Ruhnke I, Zhang D, Shini S. 2021.** Nutrition, feeding and laying hen welfare. *Anim Prod Sci* 61: 893-914. doi: 10.1071/AN20396
3. **Cotrina J. 2011.** Adición de fósforo orgánico e inorgánico en dietas de gallinas de postura comercial y su efecto comparativo sobre el rendimiento productivo. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Trujillo: Univ. Nacional de Trujillo. 77 p.
4. **Eisen E.J, Bohren B.B, McKean H.E. 1962.** The Haugh unit as a measure of egg albumen quality. *Poultry Sci* 41: 1461-1468. doi: 10.3382/ps.0411461
5. **Hamdi M, Solà-Oriol D, Franco-Rosselló R, Aliqué-Aleman R, Pérez JF. 2017.** Comparison of how different feed phosphates affect performance, bone mineralization and phosphorus retention in broilers. *Span J Agric Res* 15: e0605. doi:10.5424/sjar/2017153-11149
6. **Harms R.H, Rossi A.F, Sloan D.R, Miles R.D, Christmas R.B. 1990.** A method for estimating shell weight and correcting specific gravity for egg weight in eggshell quality studies. *Poultry Sci* 69: 48-52. doi: 10.3382/ps.0690048
7. **Haugh RR. 1937.** The Haugh unit for measuring egg quality. *US Egg Poultry Magazine* 43: 552-573.
8. **Hy Line International. 2018.** Management guide-commercial layers. [Internet]. Available in > <https://www.hyline.com/filesimages/Hy-Line-Products/Hy-Line-Product-PDFs/Brown/BRN%20COM%20ENG.pdf>
9. **Jansen S, Bues M, Baulain U, Habig C, Halle I, Petow S, Sharifi AR, et al. 2020.** Bone health or performance? Adaptation response of genetically divergent chicken layer lines to a nutritive calcium depletion. *Animals* 10: 1645. doi: 10.3390/ani10091645
10. **Keener K, McAvoy K, Foegeding J, Curtis P, Anderson K, Osborne J, Bush D. 2006.** Effect of testing temperature on internal egg quality measurements. *Poultry Sci* 85: 550-555. doi: 10.1093/ps/85.3.550
11. **Ketta M, Tùmová E. 2016.** Eggshell structure, measurements, and quality-affecting factors in laying hens: a review. *Czech J Anim Sci* 61: 299-309. doi: 10.17221/46/2015-CJAS
12. **Kibala L, Rozempolska-Rucinska I, Kasperek K, Zieba G, Lukaszewics M. 2018.** Eggshell qualities as indicative of eggshell strength for layer selection. *Braz J Poult Sci* 20: 99-102. doi: 10.1590/1806-9061-2017-0590
13. **Kim JH, Pitargue FM, Jung H, Han GP, Choi HS, Kil DY. 2017.** Effect of superdosing phytase on productive performance and egg quality in laying hens. *Asian Austral J Anim* 30: 994-998. doi: 10.5713/ajas.17.0149
14. **Li X, Zhang D, Yang T, Bryden W. 2016a.** Phosphorus bioavailability: a key aspect for conserving this critical animal

- feed resource with reference to broiler nutrition. *Agriculture* 6: 25. doi: 10.3390/agriculture6020025
15. **Li X, Bryden W.L, Zhang D. 2016b.** Available phosphorus requirement of laying hens. Australian EGG Corporation Limited. 109 p.
 16. **Murga C, Virhuez J, Vilchez C, Nakandakari L. 2020.** Comportamiento productivo y características morfológicas y mineralización de tibias de pollos de engorde suplementados con fosfatos inorgánicos de cinco fuentes comerciales. *Rev Inv Vet Perú* 31: e17843. doi: 10.3390/agriculture6020025
 17. **[NRC] National Research Council. 1994.** Nutrient requirements of poultry. 9th Rev. Washington, DC: National Academy Press. 176 p.
 18. **Proszkowiec-Weglarz M, Angel R. 2013.** Calcium and phosphorus metabolism in broilers: effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. *J Appl Poultry Res* 22: 609-627. doi: 10.3382/japr.2012-00743
 19. **Roberts J. 2004.** Factor affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. *Poultry Sci* 41: 161-177. doi: 10.2141/jpsa.41.161
 20. **Rodehutschord M. 2011.** Avances en la valoración de fósforo en aves. En: XXVII Curso de especialización FEDNA. Madrid.
 21. **Said NW, Sullivan TW, Sunde ML, Bird HR. 1984.** Effect of dietary phosphorus level and source on productive performance and egg quality of two commercial strains of laying hens. *Poultry Sci* 63: 2007-2019. doi: 10.3382/ps.0632007
 22. **Saleh AA, Elsawee M, Soliman MM, Elkou RYN, Alzawqari MH, Shukry M, Abdel-Moneim AE, Eltahan H. 2021.** Effect of bacterial or fungal phytase supplementation on the performance, egg quality, plasma biochemical parameters, and reproductive morphology of laying hens. *Animals* 11: 540. doi: 10.3390/ani11020540
 23. **Skoivan M, Englmaierová M, Skoivanová V. 2010.** Effect of different phosphorus levels on the performance and egg quality of laying hens fed wheat and maize-based diets. *Czech J Anim Sci* 55: 420-427.
 24. **Samiullah S, Roberts JR, Chousalkar. 2015.** Eggshell color in brown-egg laying hens – a review. *Poultry Sci* 94: 2566-2575. doi: 10.3382/ps/pev202
 25. **Vandepopuliere J, Lyons J. 1992.** Effect of inorganic phosphate source and dietary phosphorus level on laying hen performance and eggshell quality. *Poultry Sci* 71: 1022-1031. doi: 10.3382/ps.0711022
 26. **Wilson PB. 2017.** Recent advances in avian egg science: a review. *Poultry Sci* 96: 3747-3754. doi: 10.3382/ps/pex187