

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 148**

51 Int. Cl.:

**A01K 45/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2005 E 05808424 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 1804574**

54 Título: **Procedimientos y aparato de inyección y de toma de muestras de una sustancia a través de membranas de huevos aviares**

30 Prioridad:

**13.10.2004 US 618110 P**  
**05.10.2005 US 243777**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**29.10.2013**

73 Titular/es:

**EMBREG INC. (100.0%)**  
**P.O. Box 13989**  
**Research Triangle Park North Carolina 27709-3989, US**

72 Inventor/es:

**WOLFE, STEPHEN P.;**  
**RYBARCZYK, PHILLIP L., JR.;**  
**BRYAN, SEAN M.;**  
**SCHNUPPER, MIKE;**  
**REES, DAN;**  
**SPRENKEL, JAMIE;**  
**GROSS, EDWARD W.;**  
**ANGELL, BRANTLEY y**  
**HEBRANK, JOHN H.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 427 148 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos y aparato de inyección y de toma de muestras de una sustancia a través de membranas de huevos aviares

### Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere, en general, al campo de los huevos y, más concretamente, a unos dispositivos para inyectar y / o retirar de los huevos una sustancia.

### Antecedentes de la invención

- 10 En los criaderos de aves de corral y en otras instalaciones de procesamiento de huevos, los huevos son manipulados y procesados en grandes cantidades. El término "procesamiento" incluye el tratamiento de huevos vivos con fármacos, nutrientes, hormonas y / u otras sustancias beneficiosas mientras los embriones están todavía en el huevo "i.e. *in ovo*". Han sido empleadas inyecciones *in ovo* de varias sustancias en huevos aviares para reducir las tasas de morbilidad y mortalidad post-incubación, incrementar las tasas de crecimiento potenciales o el tamaño final del ave resultante, e incluso para influir en la determinación del género del embrión. La inyección de vacunas en huevos vivos ha sido eficazmente empleada para inmunizar las aves *in ovo*. Así mismo, es deseable en la industria de las aves de corral manipular un embrión *in ovo* para introducir moléculas de ácido nucleico extrañas (esto es, para crear un ave transgénica) o introducir células extrañas (esto es, para crear un ave híbrida) dentro del embrión en desarrollo.

- 15 Puede ser utilizada una inyección *in ovo* de un virus para propagar el virus concreto para su uso en la preparación de vacunas. Para algunas aplicaciones puede ser deseable inyectar un dispositivo de detección dentro de un huevo que contiene un embrión para recoger información a partir del mismo, por ejemplo, según lo descrito en la Patente estadounidense No. 6,244,214 de Hebrank. Así mismo, puede ser deseable retirar muestras de sustancia de los huevos, incluyendo sustancias embriónicas y extraembriónicas.

- 20 Ejemplos de sustancias y procedimientos de tratamiento *in ovo* de una inyección *in ovo*, así como de un aparato para la manipulación de una pluralidad de huevos, se describen en la Patente estadounidense No. 4,458,630 de Sharma et al. y en la Patente estadounidense No. 5,028,421 de Fredericksen et al.

- 25 Muchos de los procedimientos *in ovo* descritos anteriormente requieren un posicionamiento preciso de una aguja, un dispositivo de toma de muestras o un dispositivo de detección dentro de un huevo. Sin embargo, pueden ser difícil situar de manera precisa y con carácter repetitivo una aguja, el dispositivo de toma de muestras o el dispositivo de detección dentro de varios compartimentos de un huevo utilizando un aparato y unos procedimientos *in ovo* convencionales. De acuerdo con ello, se necesita en la técnica unos procedimientos mejorados de colocación precisa y repetitiva de unos dispositivos que incluyen, pero no se limitan a, agujas, dispositivos de detección y dispositivos de toma de muestras con diversos compartimentos y localizaciones de los huevos.

- 30 Un procedimiento de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación 1 se conoce a partir del documento US-A-3,616,262.

### Sumario de la invención

- 35 Un procedimiento de inyección y / o de toma de muestras de huevos aviares, de acuerdo con la presente invención, se define en la reivindicación 1. La sustancia puede ser depositada y / o retirada del huevo por medio de la aguja. Así mismo, se puede obtener información del interior del huevo por medio de un detector asociado con el dispositivo extendido dentro del huevo. El dispositivo es a continuación retraído del huevo. Formas de realización específicas de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes 2 a 6.

- 40 Formas de realización de la presente invención pueden ser utilizadas para situar un dispositivo en cualquier emplazamiento dentro de un huevo (por ejemplo la cavidad subgerminal). El dispositivo puede ser utilizado para administrar una sustancia y / u obtener una sustancia, y en cualquier etapa del desarrollo embrionario.

### Breve descripción de los dibujos

- 45 Las **Figs. 1A - 1B** son vistas en sección laterales de un aparato de inyección, de acuerdo con formas de realización de la presente invención.

La **Fig. 2** es una vista en sección transversal del aparato de inyección de la **Fig. 1A** tomada a lo largo de la **línea 2 - 2**.

- 50 La **Fig. 3** es una vista en sección transversal de un huevo con el aparato de inyección de la **Fig. 1A** insertado dentro de él y con el tope en relación de contacto con una membrana.

La **Fig. 4A** es una vista en perspectiva de una aguja de inyección que presenta un tope fijado a ella, de acuerdo con otra forma de realización de la presente invención.

La **Fig. 4B** es una vista en sección transversal de un huevo con el aparato de inyección de la **Fig. 4A** insertado dentro de él y con el tope en relación de contracción con una membrana.

La **Fig. 5** es una vista en sección transversal de un huevo con el aparato de inyección de la **Fig. 1A** insertado dentro de él y con el huevo en relación de contacto con un detector de fuerza, de acuerdo con otras formas de realización de la presente invención.

Las **Figs. 6A a 6C** son vistas en sección transversal, laterales de un aparato que presenta un miembro de localización dispuesto para desplazarse en vaivén dentro de un punzón y de una aguja dispuesta para desplazarse en vaivén dentro del miembro de localización, de acuerdo con formas de realización de la presente invención.

La **Fig. 7** es un diagrama de flujo que ilustra formas de realización concretas de la presente invención.

Las **Figs. 8A a 8B** son vistas en sección transversal, laterales de un aparato de inyección que presenta una aguja de inyección con un tope, en el que la aguja está rodeada por un punzón tubular que está configurado para formar una abertura en la cáscara de un huevo, en el que el punzón está formando una abertura en la cáscara del huevo en la **Fig. 8A** y en el que la aguja de inyección está insertada dentro del huevo en la **Fig. 8B**.

La **Fig. 9** es un diagrama de flujo que ilustra formas de realización concretas de la presente invención.

Las **Figs. 10A a 10F** son vistas en sección transversal, laterales de un aparato que presenta un miembro de localización dispuesto para desplazarse en vaivén dentro de un punzón y una aguja dispuesta para desplazarse en vaivén por dentro del miembro de localización.

## **Descripción detallada de la invención**

A continuación se describirá la presente invención de forma más acabada con referencia a los dibujos que se acompañan, en los que se muestran formas de realización de la invención. La presente invención puede, sin embargo, materializarse en muchas formas diferentes y no debe ser interpretada como limitada a las formas de realización definidas en la presente memoria; por el contrario, estas formas de realización se ofrecen para que la presente divulgación sea cabal y completa, y transmita en su totalidad el alcance de la invención a los expertos en la materia.

Los mismos números se refieren a los mismos elementos a lo largo de los dibujos. En las figuras, el grosor de determinadas líneas, capas, componentes, elementos o características pueden estar exageradas por razones de claridad. Las líneas interrumpidas ilustran características u operaciones opcionales a menos que se diga lo contrario. Todas las publicaciones, solicitudes de Patentes, Patentes y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan en ella por referencia, en su integridad.

La terminología utilizada en la presente memoria tiene únicamente la finalidad de la descripción de formas de realización concretas y no pretende ser limitativa de la invención. Según se utiliza en la presente memoria, las formas singulares “un”, “uno” y “el”, “la”, están destinadas a incluir también las formas plurales, a menos que del contexto se desprenda claramente lo contrario. Así mismo, debe entenderse que los términos “comprende” y / o “que comprende”, cuando se utilizan en la presente memoria descriptiva especifican la presencia de elementos característicos manifestados, números enteros, etapas, operaciones, elementos y / o componentes pero no precluyen la presencia o adición de una o más distintas características, números enteros, etapas, operaciones, elementos, componentes y / o grupos de estos. Según se utiliza en la presente memoria, el término “y / o” incluye todas y cualquiera de las combinaciones de uno o más de los elementos relacionados asociados. Según se utiliza en la presente memoria, frases tales como “entre X e Y” y “entre aproximadamente X e Y” deben ser interpretadas incluyendo X e Y. Según se utiliza en la presente memoria, frases tales como “entre aproximadamente X e Y” significan “entre aproximadamente X y aproximadamente Y”. Según se utilizan en la presente memoria, frases tales como “desde aproximadamente X hasta Y” significan “desde aproximadamente X hasta aproximadamente Y”.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos (incluyendo los términos técnicos y científicos) utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el generalmente comprendido por el experto en la materia a la cual pertenece la invención. Así mismo, se debe entender que el significado de los términos, como por ejemplo los definidos en los diccionarios habitualmente utilizados, debe ser interpretado como con su significado en el contexto de la memoria descriptiva y en la técnica relevante y no debe ser interpretado en un sentido idealizado o demasiado formal a menos que expresamente se establezca lo contrario en la presente memoria. Funciones o construcciones sobradamente conocidas pueden no describirse con detalle por razones de brevedad y / o de claridad.

Se debe entender que, cuando un elemento es designado como que está “sobre”, “fijado” a, “conectado” a, “acoplado” con, “que contacta” con, etc., otro elemento, puede estar directamente sobre, fijado a, conectado a, acoplado con, o en contacto con, el otro elemento o elementos intervinientes pueden también estar presentes. Por contra, cuando se designa un elemento como que está, por ejemplo, “directamente sobre”, “directamente fijado” a, “directamente conectado” a, “directamente acoplado” con o “directamente en contacto” con otro elemento, no existen

presentes elementos intervinientes. Así mismo, se debe apreciar por parte de los expertos en la materia que las referencias a una estructura o característica que está “adyacente” a otra característica puede presentar porciones que se solapen o que estén por debajo de la característica adyacente.

5 Términos espacialmente relativos, tales como “por debajo de”, “debajo”, “inferior”, “sobre”, “superior” y similares, pueden ser utilizados en la presente memoria para facilitar la descripción, para describir un elemento o relación de características con otro(s) elemento(s) o característica(s) según se ilustra en las figuras. Se debe entender que los términos espacialmente relativos están destinados a abarcar diferentes orientaciones del dispositivo en uso o en funcionamiento además de la orientación mostrada en las figuras. Por ejemplo, si el dispositivo en las figuras está invertido, los elementos descritos como “por debajo” o “debajo” de otros elementos o características estarían orientados “sobre” los otros elementos o características. De esta manera, el término ejemplar “por debajo de” puede abarcar tanto una orientación “sobre” como “por debajo de”. El dispositivo puede estar orientado de otra forma (rotado en un ángulo de 90 grados o en otras orientaciones) y los descriptores espacialmente relativos utilizados en la presente memoria deben ser interpretados en consecuencia. De manera similar, los términos “hacia arriba”, “hacia abajo”, “vertical”, “horizontal” y similares se utilizan en la presente memoria únicamente con fines explicativos a menos que específicamente se indique lo contrario.

20 Se debe entender que aunque los términos “primero”, “segundo”, etc., pueden ser utilizados en la presente memoria para describir diversos elementos, componentes, regiones, capas y / o secciones, estos elementos, componentes, regiones, capas y / o secciones no deben estar limitados por estos términos. Estos términos se utilizan solo para distinguir solo un elemento, componente, región, capa o sección, de otro elemento, componente, región, capa o sección. Así, un “primer” elemento, componente, región, capa o sección analizados en las líneas que siguen, podría, también ser designado con el término “segundo” elemento, componente, región, capa o sección sin apartarse de las enseñanzas de la presente invención. La secuencia de operaciones (o etapas) no está limitada al orden presentado en las reivindicaciones o figuras a menos que específicamente se indique lo contrario.

25 Los términos “aviar” e “individuos aviaries”, como son utilizados en la presente memoria, están destinados a incluir machos y hembras de cualquier especie aviar, pero están principalmente destinados a abarcar aves de corral que se crían comercialmente para huevos, carne o como mascotas. De acuerdo con ello, los términos “aviar” e “individuo aviar” están especialmente dirigidos a abarcar diversas aves incluyendo, pero no limitados a, pollos, pavos, patos, codornices, faisanes, periquitos, loros, cacatúas, cacatúas, cotorras, avestruces, emús, etc.

30 Según se utiliza en la presente memoria el término “embrión temprano” se refiere a un embrión aviar desde el tiempo de la puesta (etapa blastodérmica) a través de aproximadamente la misma etapa de desarrollo en la que las células germinales primordiales (PGCs) están migrando. En relación concreta con los embriones de pollo, un “embrión temprano” es en general aproximadamente un embrión de una etapa embrionaria 20 (H & H) o anterior. Las etapas de desarrollo del embrión de pollo son sobradamente conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, El Atlas De Desarrollo del Pollo [“The Atlas of Chick Development”], R. Bellairs & M. Osmond, eds., Academic Press, 1998, y no necesitan ser analizados con mayor detalle en la presente memoria.

40 Según se utiliza en la presente memoria, el término “blastodermo” es sobradamente conocido en la técnica. En general, un blastodermo incluye un embrión desde el tiempo de la puesta hasta el final de la gastrulación. El blastodermo algunas veces es designado en la técnica mediante las denominaciones alternativas de “disco germinal” o “disco embrionario”. Un blastodermo puede ser descrito como un disco de células aplanado que se forma durante la división en el embrión temprano y persiste hasta el final de la gastrulación. En el momento de la puesta son visibles dos regiones principales del blastodermo, el área pelúcida situada en posición central y el área opaca situada en posición periférica (The Atlas of Chick Development, R. Bellairs & M. Osmond, eds., Academic Press, 1998). Con específica relación a los embriones de pollo, el blastodermo se caracteriza típicamente como un embrión a partir del tiempo de la puesta (esto es, la Etapa IX o la Etapa X EG & K) hasta aproximadamente la etapa XIII (EG & K) o superior.

Según se utiliza en la presente memoria, los términos “inyección” e “inyectar” abarcan procedimientos de inserción de un dispositivo dentro de un huevo o un embrión, incluyendo procedimientos de administración o descarga de una sustancia dentro de un huevo o de un embrión, procedimientos de retirada de una sustancia (esto es, una muestra) de un huevo o embrión y / o procedimientos de inserción de un dispositivo detector dentro de un huevo o embrión.

50 Los términos “ave híbrida” y / o “embrión híbrido” se refieren a un ave o a un embrión receptora / receptor, respectivamente, que contiene células (esto es, células somáticas y / o gametos) de otro ave o de otro embrión, designado como “donante”.

55 Los términos “ave transgénica” y “embrión transgénico” se utilizan en la presente memoria de acuerdo con sus significados de aceptación general en la técnica. Un ave transgénica o un embrión transgénico contiene una secuencia de ácido nucleico extraña en una o más células.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “membrana” se refiere a cualquier capa de tejido dentro de un huevo que trabaje un tope fijado a una aguja u otro dispositivo *in ovo*, para impedir que la aguja sea insertada más allá de una localización deseada dentro del huevo. Membranas ejemplares dentro de un huevo incluyen, pero no se

limitan a , la membrana de la cáscara exterior, la membrana de la cáscara interior, la membrana coiroalantoidea, la membrana vitelina (VM), y la membrana amniótica (amnión).

Con referencia ahora a la **Fig. 1A** en ella se ilustra un aparato **10** de inyección para inyectar y / o retirar una sustancia de unos individuos, como por ejemplo huevos aviares, de acuerdo con formas de realización de la presente invención. El aparato **10** de inyección ilustrado incluye una aguja **12** de inyección que presenta una porción **14** del cuerpo y una porción **12a** ahusada que termina en una punta **12b**. La punta **12b** puede ser roma o puede presentar una abertura dentro de ella en comunicación con la luz (no ilustrada) de la aguja. Las agujas y las luces dispuestas dentro de las agujas son sobradamente conocidas por los expertos en la materia de la presente invención. Si la punta **12b** es roma, una abertura se forma en el lateral de la aguja adyacente a la punta que está en comunicación con la luz de la aguja.

Un tubo **16** está fijado a y se extiende alrededor de la aguja **12** de inyección en relación sustancialmente concéntrica con ella. El tubo **16** presenta una porción **16a** terminal situada a una distancia predeterminada de la punta **12b** de la aguja. La porción **16a** terminal del tubo actúa como un tope para limitar la distancia a la que la punta **12b** de la aguja puede ser insertada a través de una membrana u otro tejido de un individuo, como por ejemplo un huevo.

El tubo **16** no tiene que extenderse completamente alrededor de la aguja **12**. El tubo **16** puede solo parcialmente rodear la aguja **12**, de acuerdo con formas de realización de la presente invención.

La **Fig. 1B** ilustra un aparato **10'** de inyección para inyectar y / o retirar sustancias de individuos, como por ejemplo huevos aviares, de acuerdo con otras formas de realización de la presente invención. En la **Fig. 1B**, la aguja **12'** de inyección es una aguja de "pipeta traccionada" que presenta una porción **14'** del cuerpo muy fina, según se ilustra.

Las agujas **12, 12'** de inyección ilustradas en las **Figs. 1A - 1B** pueden ser fijadas a un tubo **16** de diversas maneras como es normalmente entendido por los expertos en la materia. Por ejemplo, una aguja y un tubo circundante pueden estar fijados por adhesivo entre sí o pueden estar fundidos entre sí por medio de uno cualquiera de los procedimientos conocidos. Formas de realización de la presente invención no están limitadas a ningún procedimiento concreto de fijación de las agujas **12, 12'** de inyección y el tubo **16**.

Las agujas **12, 12'** de inyección ilustradas en las **Figs. 1A - 1B** pueden ser fabricadas a partir de diversos materiales incluyendo, pero no limitados a, vidrio, metales o materiales poliméricos. Agujas de inyección ejemplares se encuentran disponibles en Humagen Inc. Así mismo, agujas de inyección con diversas formas, tamaños y configuraciones pueden ser utilizadas de acuerdo con formas de realización de la presente invención. Las agujas pueden presentar también puntas romas y una o más aberturas conformadas en su lateral para inyectar una sustancia dentro de un huevo o para obtener una sustancia de muestra de un huevo. Formas de realización de la presente invención no están limitadas a las agujas **12, 12'** de inyección ilustradas. El tubo **16** que rodea las agujas **12, 12'** de inyección pueden estar también fabricadas a partir de diversos materiales incluyendo, pero no limitados, a vidrio y metal.

En las formas de realización ilustradas de las **Figs. 1A - 1B**, un espacio **20** anular se define entre las agujas **12, 12'** de inyección y el tubo **16**. Un material **22** de compuesto sellador se dispone dentro del espacio **20** anular para impedir el flujo de una sustancia a través del envase **20** anular, según se ilustra en la **Fig. 2**. Pueden ser utilizados, sin limitación, materiales de compuesto sellador conocidos por los expertos en la materia. De acuerdo con formas de realización de la presente invención, el tubo **16** y la aguja **12, 12'**, pueden ser fundidos entre sí de tal manera que no exista ningún espacio anular.

De acuerdo con una forma de realización de la presente invención, las agujas **12, 12'** de inyección están dispuestas dentro de un tubo **16** capilar que presenta un diámetro exterior de aproximadamente 1,98 mm y un diámetro interior de aproximadamente 1,2 mm. Sin embargo, de acuerdo con otras formas de realización de la presente invención, el tubo **16** puede presentar diversos diámetros, longitudes y otras dimensiones, sin limitación.

La **Fig. 3** ilustra el aparato **10** de inyección de la **Fig. 1A** con la punta **12b** de la aguja **12** de inyección extendida hasta una profundidad predeterminada dentro de un huevo **1** como resultado del accionamiento del tubo **16** como un tope y haciendo contacto con una membrana **2** dentro del huevo **1**. La membrana **2** puede ser cualquier membrana entre un número indeterminado de membranas localizadas internamente dentro de un huevo. La punta **12b** de la aguja puede estar situada en cualquiera de diversas localizaciones dentro de un huevo. La localización **3** ilustrada en la **Fig. 3** es un blastodermo.

De acuerdo con otras formas de realización de la presente invención, un disco de material **30** puede rodear una aguja **12** de inyección a una distancia predeterminada de la punta **12b** de la aguja de inyección y desempeñar la función de tope, como se ilustra en las **Figs. 4A - 4B**. Como se ilustra en la **Fig. 4B**, la inserción de la aguja **12** dentro de un huevo se detiene (por ejemplo, el desplazamiento hacia abajo de la aguja resulta detenido) cuando el disco de material **30** contacta con una membrana **2**. El disco de material **30** puede estar fabricado a partir de diversos materiales y puede presentar virtualmente cualquier forma y configuración. Así mismo, un disco de material puede estar situado virtualmente en cualquier parte sobre la aguja **12**. Un disco ejemplar de material puede ser un cordón de material adhesivo aplicado a la aguja **12** de inyección (por ejemplo, en círculo o parcialmente en círculo).

De acuerdo con otras formas de realización de la presente invención, un detector **40** de fuerza puede ser utilizado para medir la fuerza ejercida sobre una membrana de un huevo mediante un tope, mediante una aguja, y / o mediante un tope y una aguja, como se ilustra en la **Fig. 5**. En la forma de realización ilustrada, el detector **40** de fuerza es una balanza de pesar situada por debajo de un huevo **1**. Cuando un tope (por ejemplo, el tubo **16**) entra en contacto con una membrana **2** dentro de un huevo **1**, la fuerza hacia abajo se mide sobre la balanza **50** de pesar. Una balanza **50** de pesar ejemplar se encuentra disponible en Ohaus Corporation (Pine Brook, NJ). Así mismo, la fuerza requerida para que la aguja **12** penetre en la membrana **2** puede ser medida por el detector **40** de fuerza. La medición de esta fuerza puede permitir a un operario detectar una posición de una aguja, o de otro dispositivo, cuando sea insertado dentro de un huevo.

Como alternativa, puede ser utilizada una célula de carga como detector **40** de fuerza. Como sin duda comprenderán los expertos en la materia, puede ser utilizado un circuito de amplificación y / o de filtrado en combinación con una célula de carga para intensificar la salida y eliminar cualquier ruido no deseado. Un convertidor analógico / digital (por ejemplo un USB LabJack U12 de LabJack Corporation, Lakewood, CO.) podría ser utilizado para obtener unas señales de fuerza con algún índice y un programa software (por ejemplo, el LabView 7.0 de National Instrument Corporation, Austin TX), podría ser utilizado para trazar un gráfico de las señales de fuerza con respecto al tiempo.

El uso de una balanza para pesar / una célula de carga puede también ser utilizado para detectar la presencia de un huevo aplastado. Por ejemplo, si una aguja es descendida pero no se registra / detecta ninguna fuerza, se sabrá que no hay huevo. De esta manera, no se lleva a cabo la inyección de una sustancia por medio de la aguja.

Con referencia a las **Figs. 6A - 6B**, un aparato de acuerdo con formas de realización de la presente invención puede incluir un punzón **50** tubular que está configurado para formar una abertura en la cáscara de un huevo **1**. En la forma de realización ilustrada, un miembro **60** de localización tubular está dispuesto para desplazarse en vaivén por dentro de un punzón **50** y una aguja **12** está dispuesta para desplazarse en vaivén por dentro del medio **60** de localización. En la **Fig. 6A**, el punzón forma una abertura en la cáscara de un huevo **1**. En la **Fig. 6B** el punzón es retraído del huevo **1** y el medio **60** de localización el cual es susceptible en desplazamiento en vaivén por dentro del punzón **50** se desplaza hacia abajo hasta el interior del huevo **1** hasta que el miembro **60** de localización contacta con una membrana **2**. Cuando se efectúa el contacto, el miembro **60** de localización se detiene en su desplazamiento hacia abajo por el interior del huevo. En la **Fig. 6C**, el miembro **60** de localización ha sido bloqueado en posición y la aguja **12** se extiende hasta una distancia predeterminada más allá del miembro **60** de localización por el interior del huevo. El miembro **60** de localización puede quedar bloqueado en posición por medio de cualquiera entre una pluralidad de procedimientos. Las configuraciones de la aguja - punzón de inyección, las cuales pueden ser utilizadas en combinación con formas de realización de la presente invención, se describen en las Patentes estadounidenses Nos. 4,903,635; 5,136,979; y el documento RE 35,973.

La **Fig. 7** es un diagrama de flujo que ilustra formas de realización concretas de la presente invención. Con referencia inicialmente al Bloque **200** un huevo aviar está orientado en una posición predeterminada (por ejemplo, con el extremo romo del huevo en una posición genéricamente hacia arriba, o con el huevo situado en posición de costado, etc.). El huevo puede estar orientado prácticamente en cualquier posición. Por ejemplo, el huevo puede estar orientado en posición horizontal o vertical (con respecto al eje geométrico largo) o en ángulo respecto de este, durante el periodo de almacenamiento. En formas de realización concretas, el huevo puede ser almacenado en la misma orientación utilizada con fines de inyección / toma de muestras. Así mismo, el huevo puede ser mantenido en posición fija (por ejemplo, dentro de un dispositivo) en el cual tanto el desplazamiento de lado como la rotación alrededor del eje largo geométrico del huevo se restringen o impiden.

Una abertura es introducida en la cáscara del huevo (Bloque **210**) por medio de un punzón o de otro dispositivo conocido por los expertos en la materia. De acuerdo con formas de realización de la presente invención, la superficie de un huevo, al menos alrededor del punto de inyección, puede ser esterilizada para reducir la contaminación microbiana (u otras) (por ejemplo con alcohol u otra solución esterilizante). Sin embargo, la esterilización de un huevo, que incluya el punto de inyección, no se requiere con respecto a formas de realización de la presente invención.

Un dispositivo se extiende a través de la abertura existente en la cáscara del huevo (Bloque **220**). Una membrana (u otro tejido) situada dentro del huevo es perforada por una aguja de inyección y la aguja es extendida dentro del huevo hasta que un tope fijado a la aguja contacta con la membrana lo que detiene el movimiento hacia abajo de la aguja por el interior del huevo (Bloque **222**). La sustancia es depositada y / o retirada del huevo por medio de la aguja de inyección (Bloque **230**). La información puede también ser detectada a partir del interior del huevo a través de un sensor (Bloque **240**). El dispositivo es, a continuación, retraído del huevo (Bloque **250**).

Como alternativa, un miembro de localización se extiende a través de una abertura existente en la cáscara de huevo hasta que contacta con una membrana situada dentro del huevo la cual detiene el movimiento hacia abajo del miembro de localización (Bloque **224**). El miembro de localización queda entonces bloqueado en posición. Una aguja, un dispositivo de toma de muestras y / o un sensor se extienden entonces hasta una distancia predeterminada más allá del miembro de localización para situar con precisión la aguja, el dispositivo de toma de muestras y / o el sensor en un emplazamiento deseado. La sustancia es depositada y / o retirada del huevo (Bloque

**230).** La información puede también ser detectada desde el interior del huevo por medio de un sensor (Bloque **240**). El dispositivo (el miembro de localización y la aguja) es a continuación retraído del huevo (Bloque **250**).

Los procedimientos descritos en la presente memoria pueden llevarse a cabo de forma completamente manual, o de forma completamente automatizada o semiautomatizada. Por ejemplo, las etapas de preparación del huevo y de preparación del embrión pueden estar indicadas para procedimientos manuales. Las etapas de introducción de una abertura en una cáscara de huevo y de inserción de un aparato de inyección pueden ser manuales pero, de modo preferente, son automáticas.

En algunas formas de realización, puede ser utilizado un dispositivo de inyección o de toma de muestras multipunto, por ejemplo, como se describe en la Patente estadounidense No. 6,032,612. Otros dispositivos ejemplares de suministro y / o de toma de muestras incluyen los descritos en la Patente estadounidense No. 5,136,979; las Patentes estadounidenses Nos. 4,681,063 y 4,903,635; y las Patentes estadounidenses Nos. 4,040,388, 4,469,047, y 4,593,646.

En una forma de realización adicional, un aparato de inyección que comprende también un detector según se describe en la Patente estadounidense No. 6,244,214, es utilizado para recabar información relacionada con la posición de un embrión (por ejemplo, blastodermo) u otra porción o compartimento de un huevo antes de o simultáneamente con la inyección dentro del huevo (con la finalidad de una toma de muestras y / o la administración de una sustancia dentro del huevo o del embrión).

Los expertos en la materia apreciarán que pueden llevarse a cabo procedimientos de la presente invención entre una pluralidad de huevos, por ejemplo, en una operación de volatería comercial.

Con referencia a las **Figs. 8A - 8B**, un aparato **10** de inyección de acuerdo con formas de realización de la presente invención, incluye un punzón **50** tubular configurado para formar una abertura en la cáscara de un huevo **1**. Una aguja (o un dispositivo de toma de muestras, un detector, etc.) **12** de inyección está situada dentro del punzón **50** y está configurada para su desplazamiento en vaivén a través de una abertura de la cáscara del huevo formada por el punzón **50**. Un tope **30** está fijado a la aguja **12** y está configurado para contactar con el extremo **50a** superior del punzón **50** cuando la aguja **12** se desplaza a través del punzón **50** por el interior del huevo **1** para limitar la distancia a la que se inserta la aguja dentro del huevo **1**. En la **Fig. 8A**, el punzón **50** forma una abertura en la cáscara de un huevo **1**. En la **Fig. 8B**, el punzón **50** sirve también como un miembro de localización y se extiende hacia abajo hasta que se produce el contacto con una membrana **2**, tras lo cual el movimiento hacia abajo del punzón queda detenido. El punzón puede entonces quedar bloqueado en posición. La aguja **12** se desplaza hacia abajo por dentro del huevo **1** hasta que el tope **30** contacta con el extremo **50a** superior del punzón **50**. De esta manera, la aguja **12** se extiende hasta una distancia predeterminada por el interior del huevo después de que se ha producido el contacto con la membrana **2** mediante el punzón / miembro de localización.

En una forma de realización ejemplar, la presente invención puede ser utilizada para administrar de manera precisa y repetida una sustancia en un huevo que contiene un embrión temprano (por ejemplo un blastodermo) o administrar una sustancia al propio embrión temprano, por ejemplo en la cavidad subgerminal. Cualquier sustancia puede ser inyectada mediante formas de realización de la presente invención incluyendo, pero no limitadas a, células, células transgénicas, vacunas, polipéptidos, agentes promotores del crecimiento, cultivos probióticos, como por ejemplo medios de exclusión competitivos, antibióticos, secuencias nucleótidas heterólogas incluyendo vectores de transferencia de genes, vitaminas, y / o marcadores, como por ejemplo tintes, etc. Las sustancias pueden ser inyectadas solas o en combinación (como por ejemplo los antibióticos pueden ser incluidos con la administración de otras sustancias). Como otro ejemplo ilustrativo, un tinte u otro marcador puede ser incluido con otras sustancias destinadas a ser administradas para proporcionar un medio de determinación acerca de si la administración se produjo en el punto deseado.

La presente invención puede también ser utilizada de modo ventajoso para introducir una secuencia nucleótida de interés en un embrión en desarrollo (de modo preferente, la secuencia nucleótida es transformada de forma estable en células embrionarias, esto es, para crear un ave transgénica (según lo definido con anterioridad). En otras formas de realización, la presente invención puede ser utilizada para introducir una célula extraña o "donante" en un embrión destinatario (esto es, para crear un embrión híbrido y, de manera opcional, un ave híbrida, según lo definido con anterioridad).

Con referencia a la **Fig. 9**, en ella se ilustra un procedimiento de un material de toma de muestras (por ejemplo un fluido alantoideo, etc.) de un huevo, de acuerdo con formas de realización de la presente invención. Un huevo está orientado con el bolsillo de aire hacia arriba (bloque **300**) y una abertura es introducida en su cáscara (bloque **310**). La manipulación de huevos y la formación de aberturas en la cáscara de un huevo son sobradamente conocidas por los expertos en la materia, y pueden ser llevadas a cabo de diversas maneras de acuerdo con formas de realización de la presente invención.

Un dispositivo de localización se extiende a través de la abertura de la cáscara del huevo hasta que efectúa el contacto con una membrana (por ejemplo, la membrana corioalantoidea (CAM)) (bloque **320**). El desplazamiento del dispositivo de localización se detiene y entonces queda, de modo preferente, bloqueado en posición por medio de

cualquiera de los diversos procedimientos conocidos. El dispositivo de localización puede estar alojado dentro de un punzón que sea utilizado para formar una abertura dentro de la cáscara del huevo. Sin embargo, formas de realización de la presente invención no están limitadas a dicha configuración. El dispositivo de localización puede presentar prácticamente cualquier forma y configuración siempre que esté configurado para contactar con una membrana, como por ejemplo la CAM, y para hacer posible que un dispositivo de toma de muestras, inyección / detección se extienda desde aquél.

El contacto con la membrana es detectado por medio de la fuerza ejercida sobre la membrana. Como se describió con anterioridad con referencia a la **Fig. 5**, un detector de fuerza puede ser utilizado para medir la fuerza ejercida sobre la membrana mediante el dispositivo de localización. La fuerza ejercida sobre la membrana puede ser medida por una balanza, una célula de carga, o cualquier otro dispositivo de detección de la fuerza o la presión. La fuerza procedente del contacto sobre la membrana no debe exceder de aproximadamente 30 gramos en cuanto la membrana puede romperse si se aplica una fuerza superior a aproximadamente 30 gramos.

De acuerdo con formas de realización de la presente invención, un dispositivo de tomas de muestras se extiende desde el dispositivo de localización bloqueado a través de la membrana hasta una distancia predeterminada (bloque **330**) y se obtiene una muestra de fluido alantoideo por medio del dispositivo de toma de muestras (bloque **340**). El dispositivo de toma de muestras puede ser una aguja configurada para extraer fluido alantoideo del huevo, como entenderán sin duda los expertos en la materia. Por ejemplo, la aguja puede presentar una punta roma y una luz que se extienda axialmente que termine en una abertura conformada dentro de una porción de la aguja adyacente a la punta. El fluido alantoideo (u otro) puede ser extraído hasta el interior de la luz por medio de la abertura tras la aplicación de la luz al vacío. La punta roma impide que la luz resulte bloqueada con el material.

La distancia hasta la que se extiende el dispositivo de toma de muestras oscila típicamente entre aproximadamente tres milímetros y aproximadamente cinco milímetros; sin embargo, son posibles otras distancias y rangos de distancias. De acuerdo con formas de realización de la presente invención, el dispositivo de toma de muestras puede incluir un tope, según lo descrito con anterioridad, que limite la distancia a la que el dispositivo de toma de muestras puede ser insertado a través de la membrana. De acuerdo con otras formas de realización de la presente invención, un dispositivo de inyección o un dispositivo de detección se pueden extender desde el dispositivo de localización bloqueado hasta el interior del huevo.

Formas de realización de la presente invención son ventajosas para obtener cualquier tipo de fluido de huevos aviares, que incluyan, pero no se limitan a, la sangre, el líquido amniótico y el fluido alantoideo.

Formas de realización de la presente invención son especialmente ventajosas para obtener el fluido alantoideo de huevos aviares. Teniendo en cuenta las distintas especies de grupos de aves, la edad del grupo de aves, el tiempo de almacenamiento y otros factores, la localización y la integridad del CAM puede ser extremadamente variable. De acuerdo con ello, la obtención de una muestra de fluido alantoideo por medio de procedimientos convencionales en los que las agujas se desplazan hasta una profundidad determinada a menudo se traducirá en una precisión de la toma de muestras defectuosa y / o variable. Formas de realización de la presente invención sitúan positivamente el CAM asegurando de esta manera una localización precisa de la aguja de muestra dentro del fluido alantoideo, así como dentro de otros fluidos, como por ejemplo la sangre o el líquido amniótico.

Con referencia ahora a las **Figs. 10A a 10F**, en ellas se ilustra un aparato **100** para la toma de muestras y / o para la inyección de una sustancia desde / dentro de un huevo aviar, de acuerdo con formas de realización de la presente invención. El aparato **100** ilustrado incluye un punzón **50** tubular que está configurado para formar una abertura en la cáscara de un huevo **1**. En la forma de realización ilustrada, un miembro **60** de localización tubular está dispuesto para desplazarse en vaivén por dentro del punzón **50** y una aguja **12** está dispuesta para desplazarse en vaivén dentro del medio **60** de localización. Un dispositivo **102** de bloqueo está fijado al punzón **50** y está configurado para bloquear en posición el miembro **60** de localización con respecto a una membrana **2** del huevo **1**. El dispositivo **102** de bloqueo ilustrado es una brida comprimible que presenta una porción **102a** terminal ahusada que está configurada para encajar de forma coincidente con una porción **104a** terminal ahusada de una carcasa **104** del aparato **100**. Cuando la brida **102** y la carcasa **104** están encajadas de manera coincidente, la brida se comprime alrededor del miembro **60** de localización e impide el desplazamiento del miembro **60** de localización con respecto al punzón **50**. Formas de realización de la presente invención no están limitadas a la brida **102** ilustrada para el bloqueo del miembro **60** de localización. Pueden ser utilizados diversos tipos de dispositivos para el bloqueo del miembro **60** de localización sin limitación.

En la **Fig. 10A**, el aparato **100** se está desplazando hacia abajo de tal manera que el punzón **50** forma una abertura (**Fig. 10B**) en la cáscara de un huevo **1**. En la **Fig. 10C**, el miembro **60** de localización, el cual es susceptible de desplazamiento en vaivén por dentro del punzón **50** se desplaza hacia abajo hasta el interior del huevo **1** hasta que el miembro **60** de localización contacta con una membrana **2**. Cuando se efectúa el contacto, el miembro **60** de localización detiene su desplazamiento hacia abajo por el interior del huevo y queda "flotando libremente" por la parte superior de la membrana **2**. El término "flotando libremente" significa que el miembro **60** de localización está descansando sobre la membrana **2** y no se aplican otras cargas sobre el miembro **60** de localización.

Todavía con referencia a la **Fig. 10C**, la carcasa **104** se desplaza también hacia abajo y encaja con la brida **102** (**Fig. 10D**) para bloquear el miembro **60** de localización con respecto al punzón **50**. La carcasa **104** es a continuación, desplazada hacia arriba según se ilustra en la **Fig. 10E** con la brida **102** encajada con aquella. En cuanto tales, la brida **102**, el punzón **50** y el miembro **60** de localización son desplazados hacia arriba como una unidad. Cuando la carcasa ha sido elevada hasta una distancia predeterminada, como se ilustra en la **Fig. 10F**, el miembro **60** de localización ya no se sitúa en relación de contacto con la membrana **2**. La aguja **12** se extiende entonces hasta una distancia predeterminada más allá del miembro **60** de localización dentro del huevo. En la forma de realización ilustrada, un tope **106** está fijado al miembro **60** de localización. La aguja **12** incluye también un tope **108** asociado con ella. Cuando la aguja es desplazada hacia abajo por dentro del huevo, el tope **108** de la aguja encaja con el tope **106** del miembro de localización el cual detiene el desplazamiento hacia abajo de la aguja **12**. Los topes **106**, **108** están configurados para hacer posible que la aguja **12** sea insertada hasta una distancia predeterminada por dentro de un huevo.

La exposición anterior es ilustrativa de la presente invención y no debe ser interpretada como limitativa de la misma. Aunque se han descrito algunas formas de realización ejemplares de la presente invención, los expertos en la materia apreciarán fácilmente que son posibles muchas modificaciones de las formas de realización ejemplares sin apartarse materialmente de las enseñanzas y ventajas novedosas de la presente invención. De acuerdo con ello, todas las modificaciones referidas están destinadas a quedar incluidas dentro del alcance de la presente invención según se define en las reivindicaciones. La invención se define por las reivindicaciones subsecuentes, incluyéndose en ella los equivalentes de las reivindicaciones.

20

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un procedimiento de inserción de un dispositivo dentro de un huevo, que comprende:
- la orientación de un huevo (1) aviar en una posición predeterminada;
  - la introducción de una abertura dentro de una cáscara del huevo;
  - 5 la extensión de un dispositivo (10; 10') a través de la abertura practicada en la cáscara del huevo, en el que el dispositivo comprende:
    - una aguja (12; 12') que comprende una punta (12b); y
    - un tope (16a; 30) que limita la distancia a la que la punta de la aguja puede ser insertada dentro del huevo a través de su membrana (2); y
    - 10 la perforación de una membrana (2) con la punta (12b) de la aguja de inyección.
- caracterizado porque** el tope (16a; 30) está fijado a la aguja a una distancia predeterminada respecto de la punta (12b) de la aguja y el procedimiento comprende también la etapa de la extensión de la punta de la aguja por dentro del huevo hasta que el tope (16a; 30) contacta con la membrana (2).
- 15 2.- El procedimiento de la Reivindicación 1, en el que el dispositivo se selecciona entre el grupo que comprende:
- (i) un dispositivo de administración y el procedimiento comprende también la etapa, después de la etapa de perforación, de liberación de una sustancia a través del dispositivo de distribución y el depósito de la sustancia dentro del huevo;
  - 20 (ii) un dispositivo de toma de muestras y el procedimiento comprende también la etapa, después de la etapa de perforación, de retirada del huevo de una muestra de sustancia; o
  - (iii) un dispositivo detector y el procedimiento comprende también la etapa, después de la etapa de perforación, de la detección con un dispositivo detector de la información procedente del interior del huevo.
- 25 3.- El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2, en el que el huevo (2) contiene un blastodermo (3), y en el que el dispositivo (10; 10') se extiende a través de la abertura de la cáscara del huevo hasta un emplazamiento dentro del blastodermo.
- 4.- El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en el que el tope comprende un disco de material (30).
- 5.- El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4 en el que el tope comprende un tubo (16) fijado a, y que se extiende alrededor de, la aguja (12) en una relación con aquél sustancialmente concéntrica, en el que el tubo presenta una porción (16a) terminal situada a una distancia predeterminada de la punta (12b) de la aguja, en el que la porción (16a) terminal del tubo actúa como un tope para limitar la distancia hasta la que la punta (12b) de la aguja puede ser insertada dentro de un huevo (2) a través de la membrana del huevo.
- 30 6.- El procedimiento de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, en el que la introducción de una abertura en la cáscara del huevo (2) comprende la formación de la abertura con un punzón (50) tubular, y en el que la extensión de un dispositivo a través de la abertura de la cáscara del huevo comprende el desplazamiento de la aguja (12; 12') de inyección a través del punzón y, a continuación, a través de la abertura formada en la carcasa del huevo.
- 35

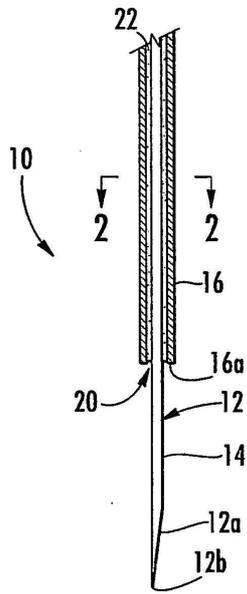


FIG. 1A

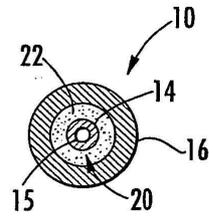


FIG. 2

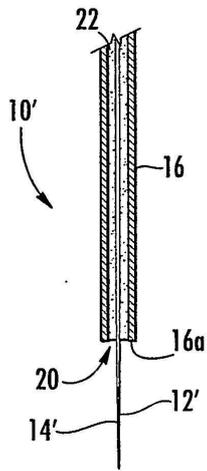


FIG. 1B

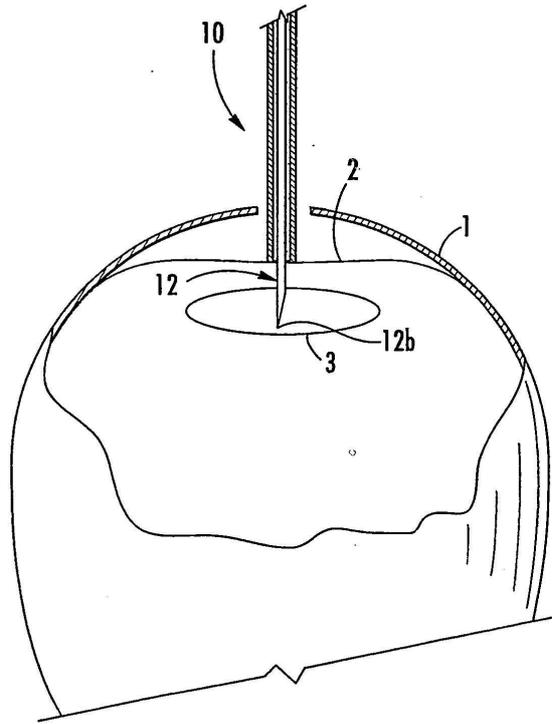
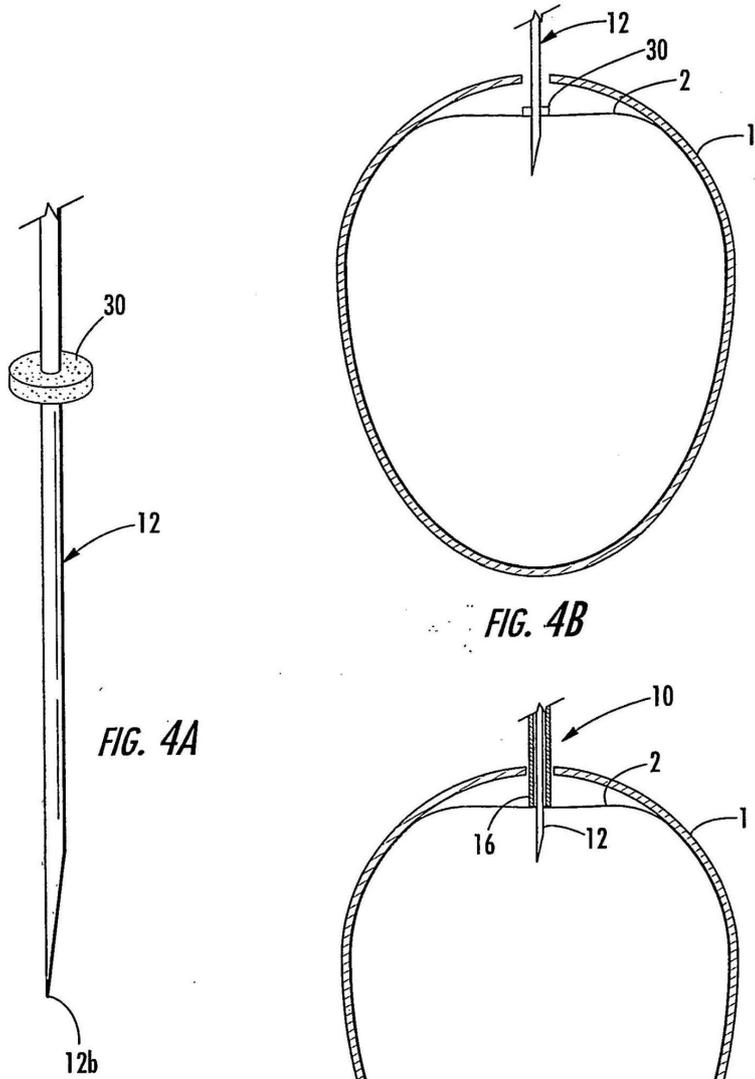
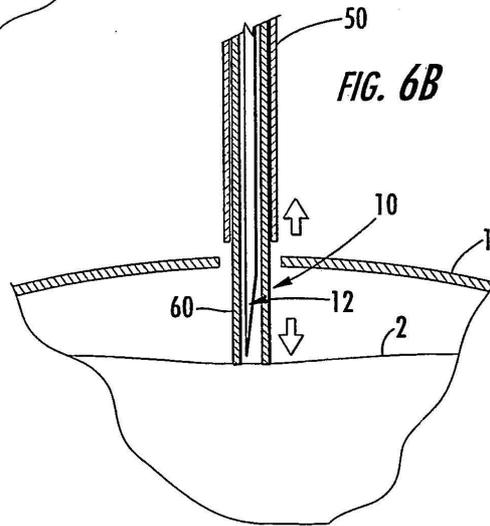
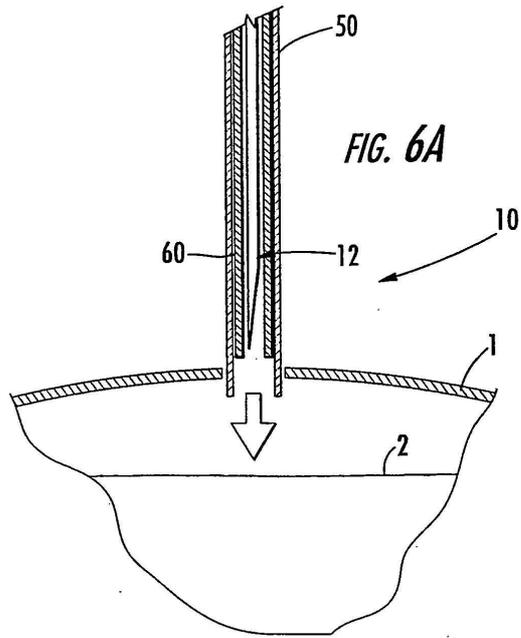
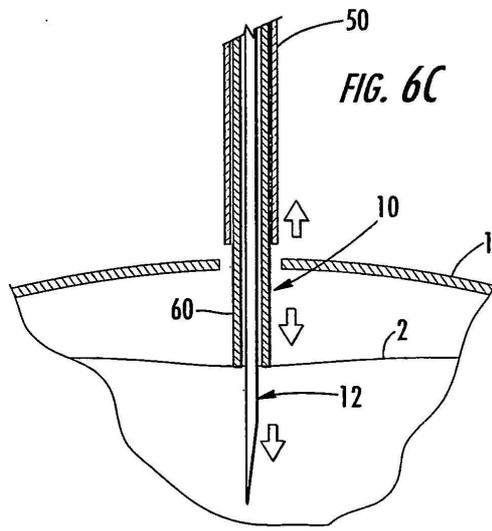


FIG. 3







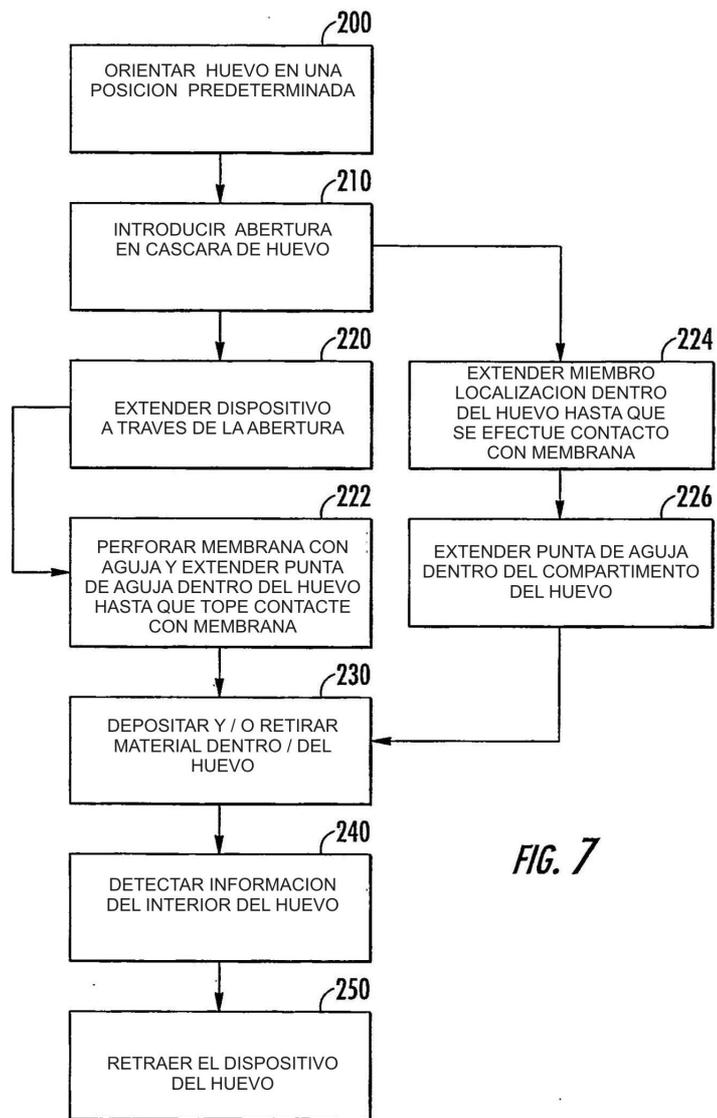
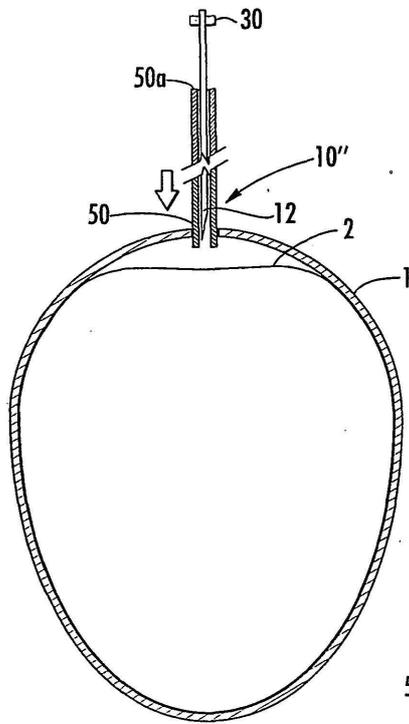
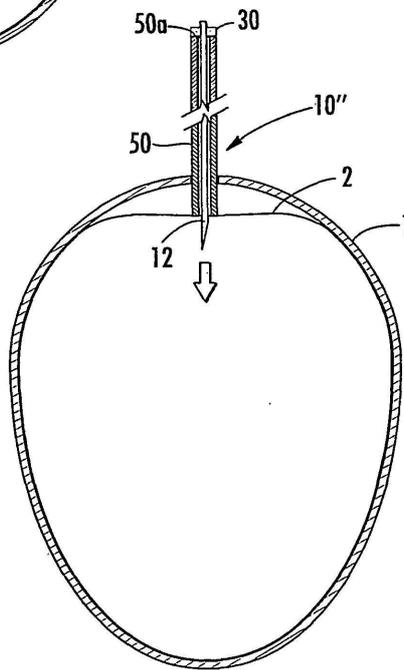


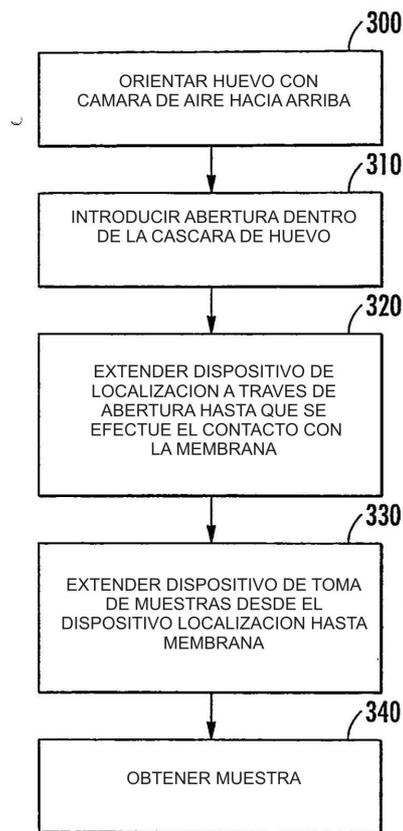
FIG. 7



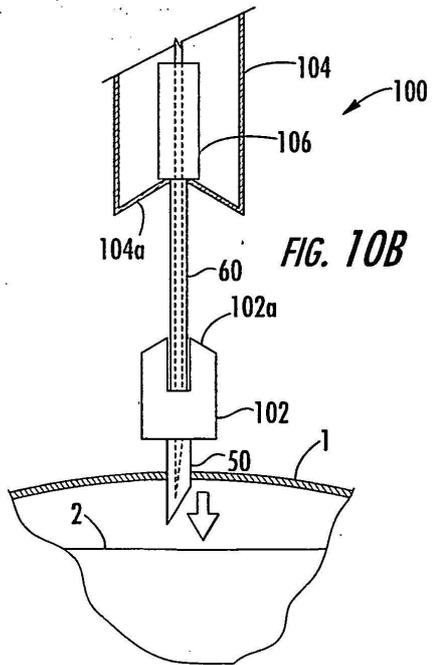
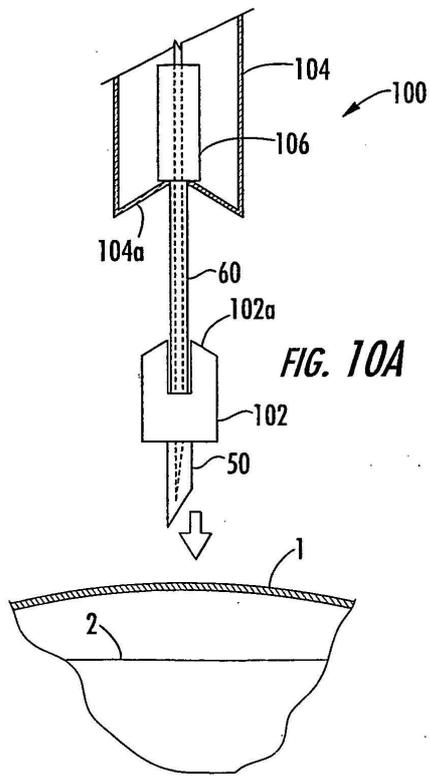
*FIG. 8A*

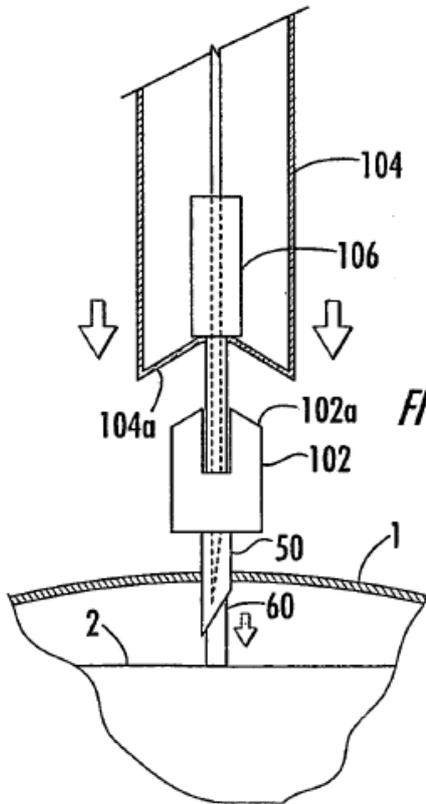


*FIG. 8B*

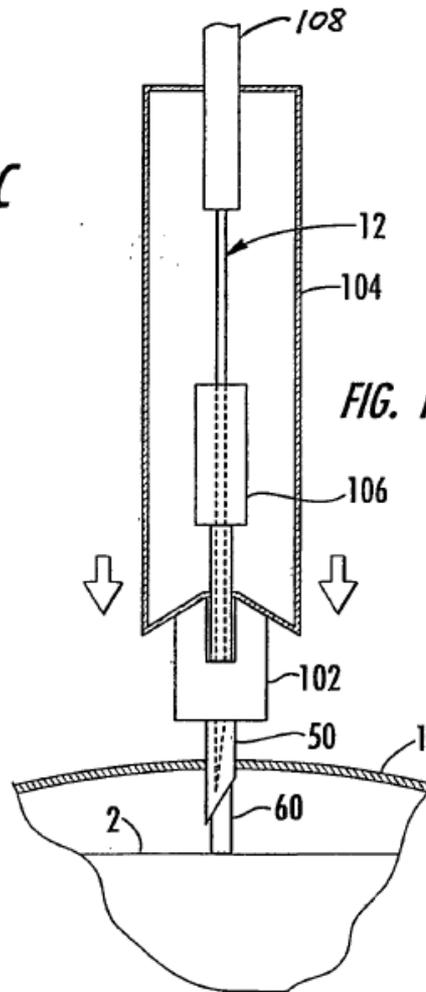


**FIG. 9**





*FIG. 10C*



*FIG. 10D*

