(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 543 055**

(51) Int. Cl.:
A01K 45/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2005** **E 05815505 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015** **EP 1804575**

(54) Título: **Procedimientos y aparato para situar con precisión un dispositivo dentro de la cavidad subgerminal de huevos aviares**

(30) Prioridad:

25.10.2004 US 621964 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.08.2015

(73) Titular/es:

ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)
100 Campus Drive
Florham Park, NJ 07932, US

(72) Inventor/es:

WOLFE, STEPHEN P.;
MAHATO, DIPAK y
RYBARCZYK, PHILLIP L., JR.

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 543 055 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 para situar con precisión un dispositivo dentro de la cavidad subgerminal de huevos aviares

Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a huevos y, más particularmente, a sistemas y procedimientos de tratamiento de huevos.

Antecedentes de la invención

En los criaderos de aves de corral y otras instalaciones de tratamiento de huevos, los huevos se manipulan y procesan en grandes cantidades. El término "tratamiento" incluye, pero no se limita a, el tratamiento de huevos vivos con medicamentos, nutrientes, hormonas y/u otras sustancias beneficiosas, mientras que los embriones se encuentran todavía en el huevo (*es decir, in ovo*). Las inyecciones *in ovo* de diversas sustancias en huevos aviares se han empleado para disminuir la morbilidad y mortalidad después de la eclosión, aumentar las tasas de crecimiento potencial o el tamaño final del ave resultante, e incluso influir en la determinación del sexo del embrión. La inyección de vacunas en huevos vivos se ha empleado eficazmente para inmunizar a las aves *in ovo*.

A continuación, haciendo referencia a la **Figura 1,** se ilustra un huevo **10** aviar. El huevo **10** ilustrado incluye una cáscara **12,** una membrana **14** de cáscara exterior**,** una membrana **16** de cáscara interior**,** y una célula **18** de aire en el extremo romo del huevo **10** entre las membranas **14, 16** de cáscara interior y exterior**.** El huevo **10** ilustrado incluye también una yema **20** y blastodermo **22** rodeado por la albúmina **24a** fina interior**,** la albúmina **24b** gruesa exterior**,** y la albúmina **24c** fina exterior**.** El blastodermo **22** es un disco celular con varias células profundas que se asienta encima de una "cavidad subgerminal" **26** (**Figura 2**). Los bordes del disco **22** de blastodermo están unidos a la yema **20.**

En la actualidad, para producir pollos quiméricos, se inyectan células en la cavidad subgerminal de un huevo aviar mediante la punción del blastodermo con una aguja y suministrando las células en la cavidad subgerminal. Sin embargo, debido a que la cavidad subgerminal dentro de un huevo aviar es muy pequeña, el suministro preciso de las células en la cavidad subgerminal puede ser difícil. Además, un operario puede tener poco o ningún control sobre la profundidad de una aguja que se extiende en la cavidad subgerminal. Además, el tamaño y la profundidad de una cavidad subgerminal pueden variar de huevo a huevo. Por tanto, la inyección de células en la cavidad subgerminal se conoce normalmente como "inyección ciega" porque puede no ser posible saber si las células se han insertado, de hecho, dentro de la cavidad subgerminal de un huevo hasta que un pollo eclosiona y pueden someterse a pruebas para pruebas quiméricas. Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de procedimientos mejorados de situar con precisión y fiabilidad dispositivos dentro de la cavidad subgerminal de huevos aviares.

Los procedimientos y aparatos de tratamiento de huevos aviares se conocen, por ejemplo, por los documentos US-B1-6244214 y WO 03/025159.

Sumario de la invención

En vista de la descripción anterior, se proporcionan procedimientos de un aparato para situar con precisión y fiabilidad un dispositivo dentro de un huevo. De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, se forma una abertura dentro de una porción de la cáscara del huevo y un dispositivo se extiende a través de la abertura. El dispositivo incluye una aguja que tiene un lumen que contiene un fluido presurizado. El flujo de fluido se controla y, en respuesta a la detección de flujo de fluido desde la aguja, se detiene el movimiento del dispositivo.

Las realizaciones de la presente invención permiten la localización precisa y fiable de una aguja dentro de la cavidad subgerminal de un huevo. De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, el dispositivo puede ser un dispositivo de suministro de sustancias que se configura para suministrar una sustancia (*por ejemplo*, células, vacunas, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, virus, antígenos, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, etc.) en la cavidad subgerminal del huevo. De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención, el dispositivo puede ser un dispositivo de retirada de sustancias configurado para extraer una sustancia de un huevo.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** es una vista en sección lateral de un huevo aviar.

La **Figura 2** es una vista en sección parcial ampliada del huevo aviar de la **Figura 1** con una aguja estando insertada en la cavidad subgerminal del mismo.

La **Figura 3** ilustra un sistema de detección de presión para su uso en la situación precisa y fiable de una aguja dentro de la cavidad subgerminal de un huevo aviar.

Las **Figuras 4** y **5** son diagramas de flujo que ilustran los procedimientos de situar con precisión y fiabilidad una aguja dentro de la cavidad subgerminal de un huevo aviar, parcialmente de acuerdo con las realizaciones de la

presente invención.

La **Figura 6** ilustra un sistema de detección de flujo para su uso en la situación precisa y fiable de una aguja dentro de la cavidad subgerminal de un huevo aviar, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describe ahora con más detalle en lo sucesivo con referencia a los dibujos adjuntos, en los que las se muestran realizaciones preferidas de la invención. Estas realizaciones se proporcionan para que esta divulgación sea minuciosa y completa, y transmita completamente el alcance de la invención a los expertos en la materia.

Los números similares se refieren a elementos similares. En las figuras, el espesor de ciertas líneas, capas, componentes, elementos o características puede estar exagerado para mayor claridad. Las líneas discontinuas ilustran características u operaciones opcionales a menos que se especifique lo contrario.

La terminología utilizada en la presente memoria tiene la finalidad de describir solamente las realizaciones particulares y no se pretende que sea limitativa de la invención. Como se utiliza en la presente memoria, las formas singulares "un", "una" y "el/la" pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se entenderá adicionalmente que las expresiones "comprende" y/o "que comprende", cuando se utilizan en la presente memoria descriptiva, especifican la presencia de características, números enteros, fases, operaciones, elementos y/o componentes, pero no excluyen la presencia o adición de una o más de otras características, números enteros, fases, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "y/o" incluye cualquiera y todas las combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados. Como se utiliza en la presente memoria, frases tales como "entre X e Y" y "entre aproximadamente X e Y" se deben interpretar como incluyendo X e Y. Como se utiliza en la presente memoria, frases tales como "entre aproximadamente X e Y" significan "entre aproximadamente X y aproximadamente Y". Como se utiliza en la presente memoria, frases tales como "de aproximadamente X a Y" significa "de aproximadamente X a 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 comúnmente entendido por un experto ordinario en la materia a la que pertenece la presente invención. Se entenderá además que términos, tales como los definidos en los diccionarios comúnmente utilizados, se deberían interpretar como teniendo un significado consistente con su significado en el contexto de la memoria descriptiva y técnica relevante y no se deben interpretar en un sentido idealizado o demasiado formal a no ser que se defina expresamente en la presente memoria. Las funciones o construcciones bien conocidas no se pueden describir en detalle por razones de brevedad y/o claridad.

Se entenderá que cuando un elemento se refiere como estando "sobre", "unido" a "conectado" a, "junto" con, "en contacto" con, etc., otro elemento, el mismo puede estar directamente sobre, unido a, conectado a, junto con o en contacto con el otro elemento o que elementos interventores pueden también estar presentes. Por el contrario, cuando un elemento se refiere como estando, por ejemplo, "directamente sobre", "unido directamente" a ", directamente conectado" a, "directamente acoplado" con o "directamente en contacto" con otro elemento, no hay elementos interventores presentes. También se apreciará por los expertos en la materia que las referencias a una estructura o característica que se dispone "adyacente" a otra característica puede tener porciones que se superponen o subyacen a la característica adyacente.

Los términos relativos espaciales, tales como "debajo", "por debajo", "inferior", "sobre", "superior" y similares, se pueden utilizar en la presente memoria para facilitar la descripción para describir un elemento o relación de la característica con otro elemento o elementos o característica o características como se ilustra en las figuras. Se entenderá que los términos relativos espaciales pretenden abarcar diferentes orientaciones del dispositivo durante su uso u operación además de la orientación representada en las figuras. Por ejemplo, si el dispositivo en las figuras se invierte, los elementos descritos como "de bajo" o "por debajo" de otros elementos o características se orientarían entonces "sobre" los otros elementos o características. Por tanto, el término ejemplar "debajo" puede abarcar tanto una orientación "sobre" como "debajo". El dispositivo se puede orientar de otra manera (girado 90 grados o en otras orientaciones) y los descriptores relativos espaciales utilizados en la presente memoria interpretarse en consecuencia. Del mismo modo, los términos "hacia arriba", "hacia abajo", "vertical", "horizontal" y similares se utilizan en la presente memoria con la finalidad de explicar solamente, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Se entenderá que, si bien los términos "primero", "segundo", etc., se pueden utilizar 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 a estos términos. Estos términos se utilizan solamente para distinguir un elemento, componente, región, capa o sección de otro elemento, componente, región, capa o sección. Por lo tanto, un "primer" elemento, componente, región, capa o sección descrito más adelante podría denominarse también un "segundo" elemento, componente, región, capa o sección sin apartarse de las enseñanzas de la presente invención. La secuencia de operaciones (o fases) no se limita al orden presentado en las reivindicaciones o

en las figuras a menos que se indique específicamente lo contrario.

Los términos "aviar" y "sujetos aviares", como se utiliza en la presente memoria, pretenden incluir a machos y hembras de cualquier especie aviar, pero pretende abarcar principalmente aves de corral que se crían comercialmente para huevos, carne o como animales de compañía. En consecuencia, los términos "aviar" y "sujeto aviar" pretenden sobre todo abarcar diversas aves, incluyendo, pero sin limitarse a, pollos, pavos, patos, gansos, codornices, faisanes, periquitos, loros, cacatúa, ninfa, avestruz, emú, etc.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "embrión temprano" se refiere a un embrión de ave desde el momento de la puesta (fase blastodérmica) a través de la fase de desarrollo donde las células germinales primordiales (PGC) están migrando. Con particular respecto a los embriones de pollo, un "embrión temprano" es generalmente aproximadamente un embrión de fase embrionaria 20 (H & H) o temprano. Las fases de desarrollo del embrión de pollo son bien entendidas en la técnica, *véase, por ejemplo,* El Atlas de Desarrollo del Pollo, R. y M. Bellairs Osmond, eds., Academic Press, 1998.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "blastodermo" tiene su significado entendido en la técnica. Por lo general, un blastodermo incluye un embrión desde el momento de la puesta hasta de la final de la gastrulación. El blastodermo es referido a veces, mediante denominaciones alternativas, "disco germinal" o "disco embrionario" en la técnica. Un blastodermo se puede describir como un disco aplanado de células que se forma durante la escisión en el embrión temprano y persiste hasta el final de la gastrulación. Al momento de la puesta, dos importantes regiones del blastodermo son visibles, el área situada centralmente, pelúcida y el área situada periféricamente, opaca (El Atlas de Desarrollo del Pollo, R. y M. Bellairs Osmond, eds., Academic Press, 1998). Con particular respecto a los embriones de pollo, el blastodermo se caracteriza típicamente como un embrión desde el momento de la puesta (*es decir,* Fase IX o Fase X EG&K) a través de aproximadamente la fase XIII (EG&K) o superior.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "inyección" y "inyectando" abarcan procedimientos de inserción de un dispositivo en un huevo, incluidos los procedimientos de suministro o descarga de una sustancia en un huevo, los procedimientos de retirada de una sustancia (*es decir*., una muestra) de un huevo y/o los procedimientos de inserción de un dispositivo detector en un huevo.

Las expresiones "ave quimérica" o "embrión quimérico" se refieren a un ave o embrión receptor, respectivamente, que contiene células de otra ave o embrión, referido como "donante". Las expresiones "aves transgénica" y "embrión transgénico" se utilizan en la presente memoria de acuerdo con sus significados generalmente entendidos en la técnica. Un ave transgénica o embrión transgénico contiene una secuencia de ácido nucleico extraño en una o más células.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "membrana" se refiere a cualquier capa de tejido dentro de un huevo. Ejemplos de membranas dentro de un huevo incluyen, pero no se limitan a, la membrana de cáscara exterior, membrana de cáscara interior, membrana corioalantoidea, Membrana VM, y membrana amniótica (amnios).

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "aguja", "pipeta", y "micropipeta" pretender ser intercambiables.

Haciendo referencia a la **Figura 2,** se ilustra un huevo **10** aviar con una aguja **30** estando insertada en la cavidad **26** subgerminal del mismo, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. La aguja **30** contiene un lumen a través del que se suministra el fluido que se deposita dentro de la cavidad **26** subgerminal del huevo, como se entenderá por los expertos en la materia. Un sistema **40** de detección de presión (**Figura 3**) se utiliza para determinar con precisión cuando la punta de la aguja **30** pasa a la membrana **25** vitelina y entra en la cavidad **26** subgerminal**.** El sistema **40** de detección de presión opera sobre el principio de que el fluido retenido dentro de la aguja **30** se retiene en cierta medida por la tensión superficial entre las paredes del lumen de la aguja. A fin de que el fluido fluya fuera de la salida del lumen en la punta de la aguja cuando la punta de la aguja está rodeada por aire, se debe aplicar una presión mínima al otro extremo del lumen (*es decir,* en la entrada del lumen), tal como se comprenderá por los expertos en la materia. Sin embargo, si la salida del lumen está sumergida en un líquido, tal como agua, la tensión superficial se elimina sustancialmente y el fluido dentro del lumen fluirá fuera del lumen con mucho menos presión aplicada a la entrada del lumen, también como se bien entenderá por los expertos en la materia.

Los solicitantes han encontrado que se requiere una presión significativamente mayor en la entrada lumen para provocar el flujo a través del lumen cuando se inserta la salida del lumen dentro de la albúmina en comparación a cuando la salida del lumen se dispone rodeada de aire. Aunque no se desee quedar ligado a ninguna teoría particular, los solicitantes creen que esto puede ser debido, al menos en parte, a la alta viscosidad de la albúmina, en comparación con otros fluidos dentro de un huevo. Los solicitantes creen además que el fluido subgerminal en la cavidad subgerminal tiene características similares al agua, por lo que requiere mucha menos presión para provocar el flujo de fluido desde la salida del lumen en comparación a cuando está rodeada de aire. La diferencia entre la presión requerida para provocar el flujo de fluido cuando la aguja se dispone dentro de albúmina en comparación a cuando la aguja se dispone dentro de la cavidad subgerminal, permite la determinación precisa de cuando la aguja se coloca dentro de la cavidad subgerminal a través de un sensor de presión.

Haciendo referencia a la **Figura 3,** se ilustra un sistema **40** de detección de presión configurado para detectar con fiabilidad y precisión cuando se inserta la punta de la aguja dentro de la cavidad subgerminal de un huevo aviar. El sistema **40** ilustrado incluye un depósito **42** de presión**,** una válvula **44** de pinza**,** un transductor **46** de presión**,** una jeringa **48** de carga**,** y una guía de deslizamiento **50** lineal**.** Una micropipeta **30** (que sirve la función de una aguja descrita anteriormente) se configura para suministrar el material *(por ejemplo,* células, vacunas, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, virus, antígenos, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, etc.) en la cavidad subgerminal de un huevo aviar. La micropipeta **30** contiene un fluido y se presuriza por el depósito **42** de presión a una presión predeterminada. Esta presión predeterminada es una presión donde el fluido no fluirá a través de la micropipeta **30** cuando la punta de la micropipeta se encuentra en la albúmina, pero fluirá a través de la micropipeta **30** cuando la punta de la micropipeta pasa a la cavidad subgerminal. El transductor **46** de presión detecta un cambio en la presión del fluido en la micropipeta **30** a medida que la punta de la micropipeta **30** se mueve en la cavidad subgerminal (lo que hace que el fluido fluya fuera de la micropipeta **30**).

El depósito **42** de presión puede ser una fuente de aire comprimido u otro gas que se conecta a un recipiente a través de una entrada de gas y tiene un tubo que va desde la región de fluido del recipiente hasta una salida de líquido. En la realización ilustrada, una válvula **47** de tres vías se coloca entre la válvula **44** de pinza y la jeringa **48** de carga**.** La válvula **44** de pinza facilita la presurización de la micropipeta **30** a través del depósito **42** de presión**.** La válvula **47** de tres vías aísla la jeringa **48** de carga cuando la micropipeta **30** está siendo sometida a presión y aísla el depósito **42** de presión cuando el fluido se carga en la micropipeta **30** a través de la jeringa **48** de carga**.** La válvula **49** de tres vías aísla el transductor **46** de presión cuando el fluido se carga en la micropipeta **30** mediante una jeringa **48** de carga**.**

La guía de deslizamiento **50** lineal puede ser una tabla X-Y convencional, que es bien conocida por los expertos en la materia. La guía de deslizamiento **50** lineal controla con precisión el movimiento de la micropipeta **30.** El transductor **46** de presión se configura para detectar un cambio en la presión del fluido dentro del lumen de la micropipeta.

El sistema **40** de detección de presión se controla preferentemente por ordenador. Como tal, una señal desde el transductor de presión se puede utilizar para controlar el movimiento de la micropipeta **30.** De acuerdo con otras realizaciones se utiliza en las que un sensor de flujo, una señal procedente del sensor de flujo se puede utilizar para controlar el movimiento de la micropipeta **30.**

Las realizaciones de la presente invención tienen muchas ventajas. Por ejemplo, las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar un procedimiento más fiable de suministro de células y otros materiales a la cavidad subgerminal de huevos aviares que los procedimientos convencionales. Por otra parte, la utilización de un sensor de presión proporciona retroalimentación para determinar cuándo se ha producido el suministro de células en la cavidad subgerminal. El uso de una guía de deslizamiento **50** lineal para controlar con precisión la profundidad de la aguja de inyección también es ventajoso. El deslizamiento lineal ofrece un movimiento controlado de la aguja. Cuando la inyección se realiza con la mano, no hay manera de saber si el movimiento lateral de la mano está presente, lo que provoca que la membrana vitelina y/u otra membrana de cáscara interior se desgarre o si hay exceso de movimiento vertical colocando la aguja demasiado profunda en áreas por debajo o por encima de la cavidad subgerminal. Además, la caída de presión se puede correlacionar linealmente con el volumen suministrado, proporcionando de este modo un procedimiento muy preciso para el suministro de volúmenes precisos *(por ejemplo,* dentro de 0,1 micro-litros).

La **Figura 4** es un diagrama de flujo que ilustra los procedimientos de situar con precisión un dispositivo en la cavidad subgerminal de un huevo y suministrar material al mismo. Cabe señalar que las funciones observadas en los bloques se pueden producir fuera del orden señalado en la **Figura 4.** Dos (o más) bloques mostrados en sucesión pueden, de hecho, ejecutarse sustancialmente en concurrencia o los bloques pueden, a veces, ejecutarse en el orden inverso, dependiendo de la funcionalidad en cuestión.

Inicialmente, se forma una abertura en la cáscara de un huevo aviar (Bloque **100**). La abertura se puede formar de varias maneras, incluyendo a través de un punzón u otro dispositivo conocido por los expertos en la materia. Además, la abertura se puede formar en cualquier lugar adecuado, *por ejemplo,* en el lado del huevo cerca del eje ecuatorial, en cada extremo del huevo, etc. En una realización de la invención, la abertura en la cáscara del huevo se introduce en la porción orientada hacia arriba de la cáscara de un huevo que se encuentra generalmente horizontalmente. Sin embargo, las realizaciones de la presente invención no se limitan a ninguna orientación particular de un huevo.

La superficie de un huevo, al menos alrededor del sitio de formación de la abertura se puede, por ejemplo, desinfectar para reducir la contaminación microbiana (u otra) (*por ejemplo,* con una otra solución desinfectante o alcohol). Sin embargo, la desinfección de un huevo, incluyendo el sitio de la abertura, no se requiere con respecto a las realizaciones de la presente invención.

Una aguja con un lumen que contiene un fluido se inserta en la albúmina del huevo a través de la abertura (Bloque **105**). El fluido dentro del lumen de la aguja se presuriza (*por ejemplo,* aproximadamente de 0,01 Bar a 0,05 Bar (cinco a veinte pulgadas de agua)) mediante la abertura de una válvula **44** de pinza (Bloque **110**) y la presión se

controla mediante un sistema de detección de presión como se ha descrito anteriormente con respecto a **Figura 3.** La válvula **44** de pinza se cierra después (Bloque **115**) y la aguja se mueve dentro y a través de la albúmina (Bloque **120**). Cuando se detecta una caída de presión dentro del lumen, el movimiento de la aguja se detiene y la salida del lumen de la aguja se encuentra dentro de la cavidad subgerminal del huevo (Bloque **125**). Un material fluido fluye en la cavidad subgerminal a causa de la caída de presión (Bloque **130**). El fluido que fluye desde el lumen puede ser el material que se va a suministrar en el huevo (*por ejemplo,* el fluido que contiene células, vacunas, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, virus, antígenos, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, etc.). Como alternativa, el material que se va a suministrar en un huevo puede seguir el fluido inicial que fluye debido a la caída de presión.

Cuando se detecta una caída de presión predeterminada dentro del lumen (Bloque **135**), que se correlaciona con un volumen predeterminado de líquido que está siendo suministrado en la cavidad subgerminal, el dispositivo se retrae del huevo (Bloque **140**). La abertura en la cáscara de huevo se puede sellar con un sellador (Bloque **145**) y el huevo se puede incubar hasta su eclosión (Bloque **150**).

De acuerdo con la presente invención, un sensor de flujo bajo o sensor de flujo másico se puede utilizar en lugar de un sensor de presión. En tal realización, el sensor de flujo se puede colocar en serie (o fluir a través de) en comparación con el sensor de presión que se múltiple en el lateral de la trayectoria de flujo. Esto podría permitir reducciones tanto de la trayectoria de flujo como del volumen de flujo en comparación con un sistema de detección de presión descrito anteriormente. Este sistema podría utilizar un sensor de flujo de líquido o gas. Si se utiliza un sensor de flujo de gas, el mismo eliminaría el depósito de presión como la presión del gas aplicándose directamente a la línea de fluido después del sensor de flujo, pero antes de la micropipeta o aguja. Por lo tanto la interfaz gas/líquido estaría dentro de la tubería, contrario a estar el interior de un depósito de presión.

La **Figura 5** es un diagrama de flujo que ilustra los procedimientos de situar con precisión un dispositivo en la cavidad subgerminal de un huevo y suministrar material (*por ejemplo,* células, vacunas, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, virus, antígenos, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, etc.) al mismo, de acuerdo con otras realizaciones de la presente invención. Cabe señalar que las funciones observadas en los bloques se pueden producirse fuera del orden señalado en la **Figura 5.** Dos (o más) bloques mostrados en sucesión pueden, de hecho, ejecutarse sustancialmente en concurrencia o los bloques pueden, a veces, ejecutarse en el orden inverso, dependiendo de la funcionalidad en cuestión.

En un principio, se forma una abertura en la cáscara de un huevo aviar (Bloque **200**). La abertura se puede formar en diversas formas, incluyendo a través de un punzón u otro dispositivo conocido por los expertos en la materia. Además, la abertura se puede formar en cualquier lugar adecuado, *por ejemplo,* en el lado del huevo cerca del eje ecuatorial, en cada extremo del huevo, etc. En una realización preferida particular de la invención, la abertura en la cáscara del huevo se introduce en la porción orientada hacia arriba de la cáscara de un huevo que se encuentra generalmente horizontalmente. Sin embargo, las realizaciones de la presente invención no se limitan a ninguna orientación particular de un huevo.

De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, la superficie de un huevo, al menos alrededor del sitio de la formación de la abertura se puede, por ejemplo, desinfectar para reducir la contaminación microbiana (u otra) (*por ejemplo,* con un alcohol u otra solución desinfectante). Sin embargo, la desinfección de un huevo, incluyendo el sitio de la abertura, no se requiere con respecto a las realizaciones de la presente invención.

Una aguja con un lumen que contiene un fluido se inserta en la albúmina del huevo a través de la abertura (Bloque **205**). El fluido dentro del lumen de la aguja se presuriza (*por ejemplo,* aproximadamente de 0,01 Bar a 0,05 Bar (cinco a veinte pulgadas de agua)) y la aguja se mueve dentro y a través de la albúmina (Bloque **210**). Cuando se detecta el flujo de fluido a través del lumen, el movimiento de la aguja se detiene y la aguja se sitúa correctamente dentro de la cavidad subgerminal del huevo (Bloque **215**). Un material fluido (*por ejemplo,* el fluido que contiene células, vacunas, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, virus, antígenos, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, etc.) puede fluir dentro de la cavidad subgerminal (Bloque **220**). Cuando se calcula un flujo predeterminado desde el lumen en la cavidad subgerminal en base a la velocidad de flujo media a través de un sensor de flujo y un tiempo de dosificación (Bloque **225**), se detiene el suministro de fluido y el dispositivo se retrae del huevo (Bloque **230**). La señal procedente del sensor de flujo se integra para obtener el volumen de fluido suministrado. La abertura en la cáscara de huevo se puede sellar con un sellador (Bloque **235**) y el huevo se puede incubar hasta su eclosión (Bloque **240**).

La velocidad de flujo a la cavidad subgerminal se puede incrementar mediante la presurización del depósito de presión **(42, Figura 3**) cuando la aguja se sitúa en la albúmina dentro de un huevo o una vez que la aguja está en la cavidad subgerminal.

Haciendo referencia a la **Figura 6,** se ilustra un sistema **300** de detección de flujo configurado para detectar con fiabilidad y precisión cuando se inserta la punta de la aguja dentro de la cavidad subgerminal de un huevo aviar, de acuerdo con realizaciones de la presente invención. El sistema **300** ilustrado incluye un regulador **302** de presión que regula el flujo de gas comprimido (*por ejemplo*, aire) desde una fuente a presión, un medidor **304** de flujo másico**,** una válvula **47** de tres vías**,** y una micropipeta **30** (que sirve la función de la aguja antes descrita). La micropipeta **30** se configura para suministrar el material (*por ejemplo,* células, vacunas, ácidos nucleicos, proteínas,

péptidos, virus, antígenos, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, etc.) en la cavidad subgerminal de un huevo aviar. La micropipeta **30** que contiene el material que se va a suministrar en un huevo se presuriza a través de un gas comprimido desde una fuente de gas comprimido a una presión predeterminada. Esta presión predeterminada es una presión donde el fluido no fluirá a través de la micropipeta **30** cuando la punta de la micropipeta se encuentra en albúmina pero que fluirá a través de la micropipeta **30** cuando la punta de la micropipeta pasa a la cavidad subgerminal. El medidor de flujo másico (*por ejemplo,* un medidor **304** de flujo másico de gas) detecta el flujo de fluido a través de la micropipeta **30** a medida que la punta de la micropipeta **30** se mueve en la cavidad subgerminal (lo que hace que el fluido fluya fuera de la micropipeta **30**). Aunque no se ilustra, el sistema **300** de detección de flujo puede utilizar también una guía de deslizamiento lineal para controlar con precisión el movimiento de la micropipeta **30.**

En la realización ilustrada, la válvula 47 de tres vías se sitúa entre el medidor **304** de flujo y la fuente de fluido que se va a suministrar en un huevo. La fuente de fluido puede ser una bomba u otro dispositivo configurado para suministrar fluido u otro material a la micropipeta **30.** La válvula **47** de tres vías aísla la fuente de aire comprimido cuando el fluido se carga en la micropipeta **30** y aísla la fuente de fluido cuando la micropipeta **30** está siendo presurizada.

El sistema **300** de detección de flujo ilustrado se controla preferentemente por ordenador. Como tal, una señal procedente del medidor **304** de flujo se puede utilizar para controlar el movimiento de la micropipeta **30.**

Los expertos en la materia apreciarán que los procedimientos de la presente invención se pueden realizar en una pluralidad de huevos, *por ejemplo,* en una operación aves de corral comercial. Por otra parte, los procedimientos descritos en la presente memoria pueden ser totalmente manuales, totalmente automatizados, o semi-automatizados.

Lo anterior es ilustrativo de la presente invención y no debe interpretarse como una limitación de la misma. Aunque se han descrito unas pocas realizaciones ejemplares de la presente invención, los expertos en la materia apreciarán fácilmente que son posibles muchas modificaciones en las realizaciones ejemplares sin apartarse materialmente de las nuevas enseñanzas y ventajas de la presente invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para situar un dispositivo dentro de un huevo, que comprende:

formar (200) una abertura dentro de una porción de la cáscara (12) del huevo (10);

extender (205) un dispositivo a través de la abertura y en el huevo, en el que el dispositivo comprende una aguja (30) que tiene un lumen que contiene un fluido presurizado, y en el que el lumen comprende una salida,

caracterizado porque además comprende

detectar el flujo del fluido a través de la salida del lumen; y

detener el movimiento (215) del dispositivo (30) en respuesta a la detección del flujo de fluido.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el dispositivo comprende un dispositivo (30) de suministro de sustancias y que además comprende inyectar (220) una sustancia en el huevo (10) a través del dispositivo de suministro de sustancias en respuesta al movimiento de parada (215) del dispositivo.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la sustancia es seleccionada del grupo que consiste en células, vacunas, ácidos nucleico, proteínas, péptidos, virus, antígenos, hormonas, factores de crecimiento y citoquinas.

4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo comprende un dispositivo de retirada de sustancias y que además comprende retirar una sustancia del huevo (10) a través del dispositivo de retirada de sustancias (30) en respuesta al movimiento de parada del dispositivo.

5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende:

retirar (230) el dispositivo (30) del huevo (10); y sellar (235) la abertura en la cáscara del huevo.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende incubar (240) el huevo hasta su eclosión.

7. Un aparato configurado para ser insertado de forma extraíble dentro de un huevo a través de una abertura en la cáscara (12) de un huevo (10), que comprende:

una aguja (30) extensible y retráctil, en el que la aguja comprende un lumen que contiene fluido presurizado, caracterizado porque además comprende

un sensor (304) de flujo configurado para detectar el flujo de fluido a través del lumen cuando la aguja (30) se mueve a través del material en un huevo, en el que el movimiento de la aguja (30) se detiene en respuesta al sensor (304) de flujo que detecta el flujo de fluido.

8. El aparato de la reivindicación 7, en el que la aguja (30) comprende un dispositivo de suministro de sustancias o un dispositivo de retirada de sustancias.

9. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, que además comprende un punzón configurado para formar una abertura en la cáscara (12) de un huevo (10).

10. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el sensor de flujo comprende un sensor de (304) flujo másico de gas.

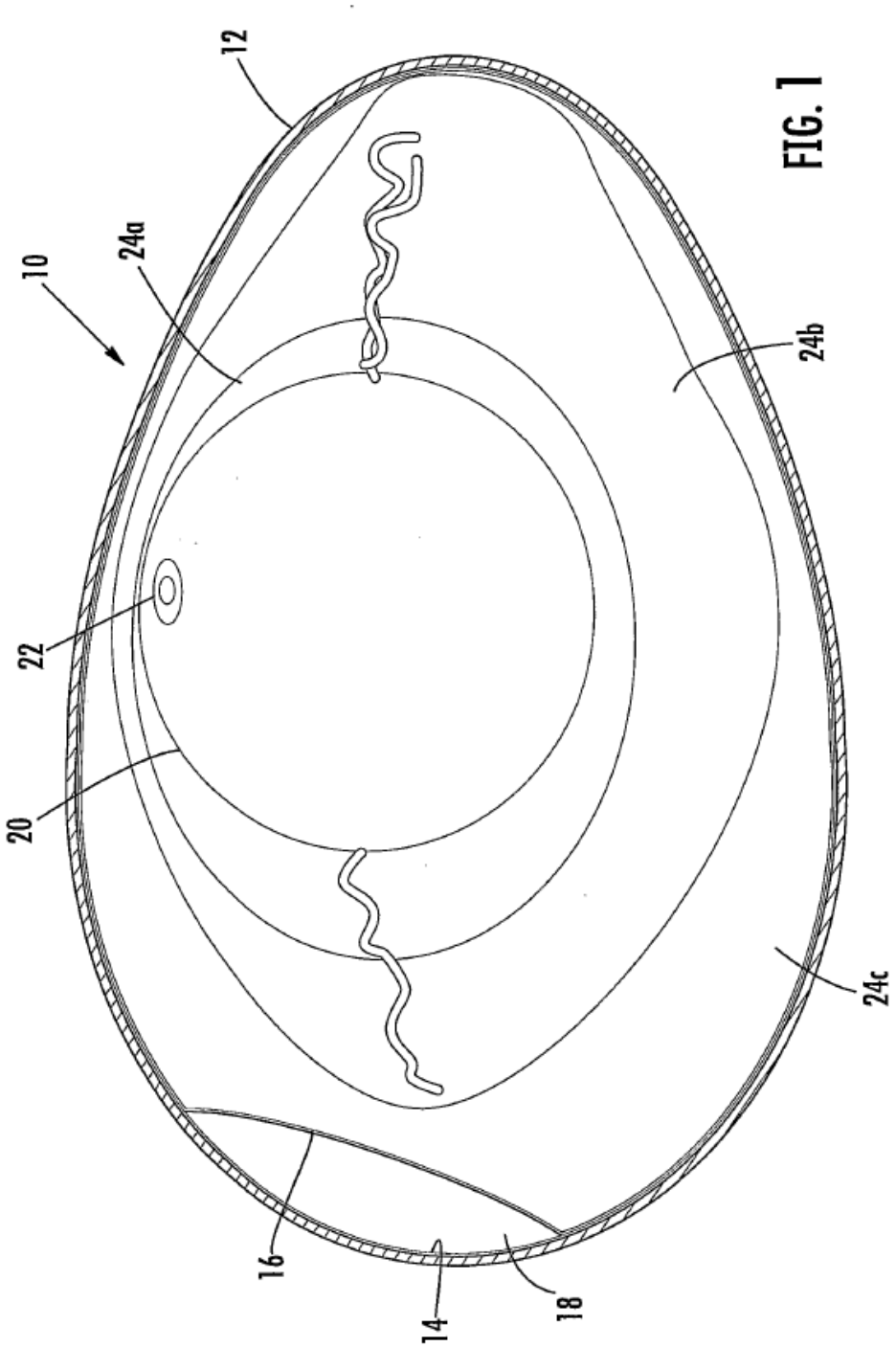

FIG. 1

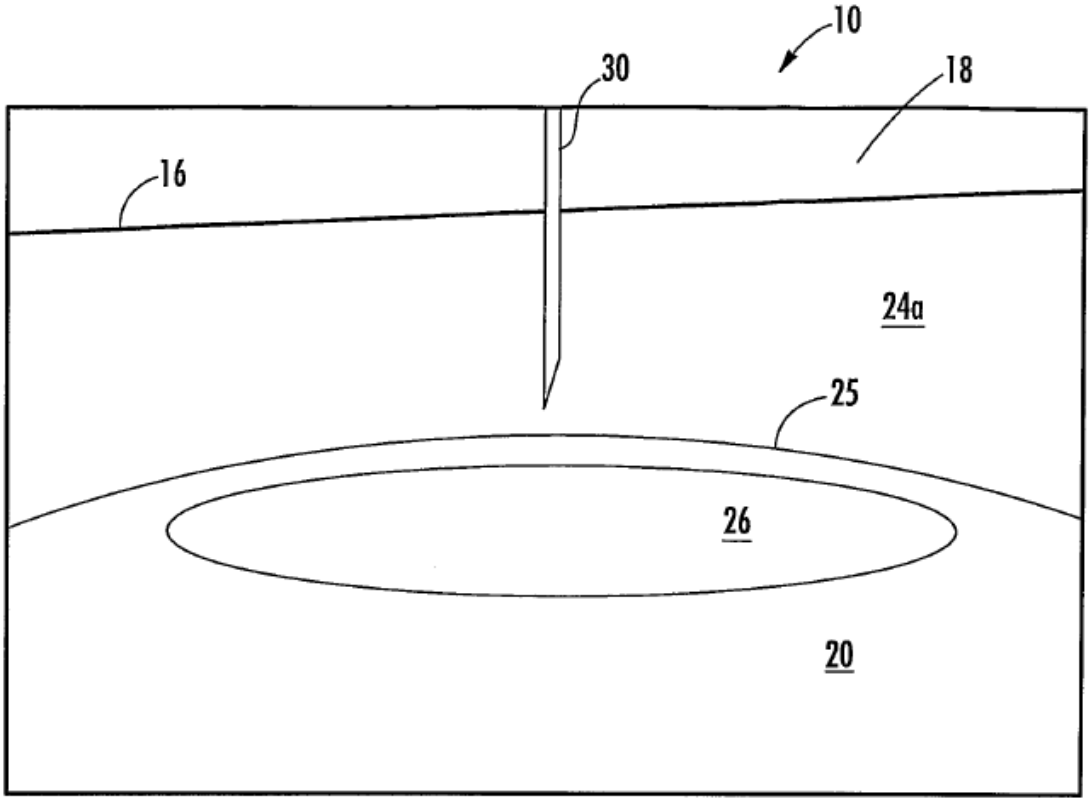

FIG. 2

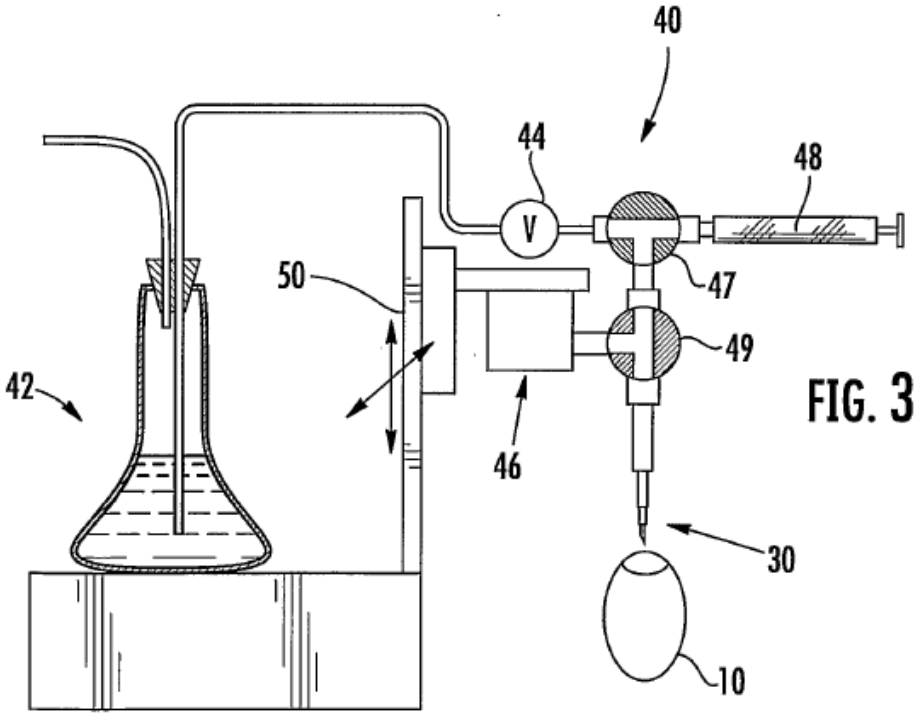

FIG. 3

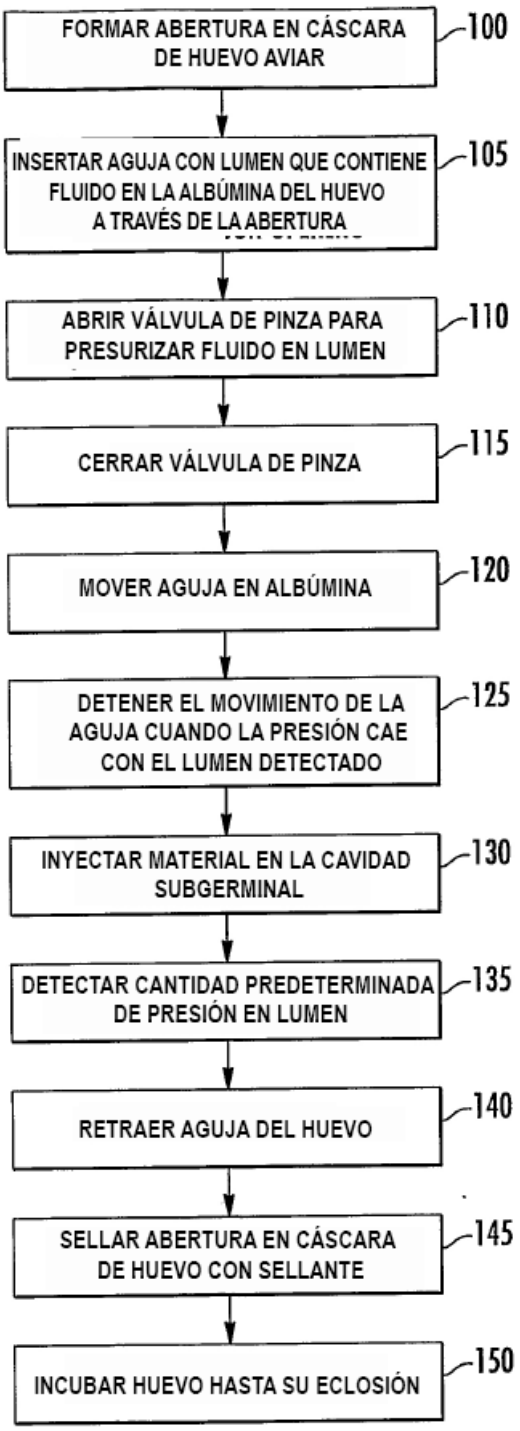
FORMAR ABERTURA EN CÁSCARA DE HUEVO AVIAR
100
INSERTAR AGUJA CON LUMEN QUE CONTIENE FLUIDO EN LA ALBÚMINA DEL HUEVO A TRAVÉS DE LA ABERTURA
105
ABRIR VÁLVULA DE PINZA PARA PRESURIZAR FLUIDO EN LUMEN
110
CERRAR VÁLVULA DE PINZA
115
MOVER AGUJA EN ALBÚMINA
120
DETENER EL MOVIMIENTO DE LA AGUJA CUANDO LA PRESIÓN CAE CON EL LUMEN DETECTADO
125
INYECTAR MATERIAL EN LA CAVIDAD SUBGERMINAL
130
DETECTAR CANTIDAD PREDETERMINADA DE PRESIÓN EN LUMEN
135
RETRAER AGUJA DEL HUEVO
140
SELLAR ABERTURA EN CÁSCARA DE HUEVO CON SELLANTE
145
INCUBAR HUEVO HASTA SU ECLOSIÓN
150

FIG. 4

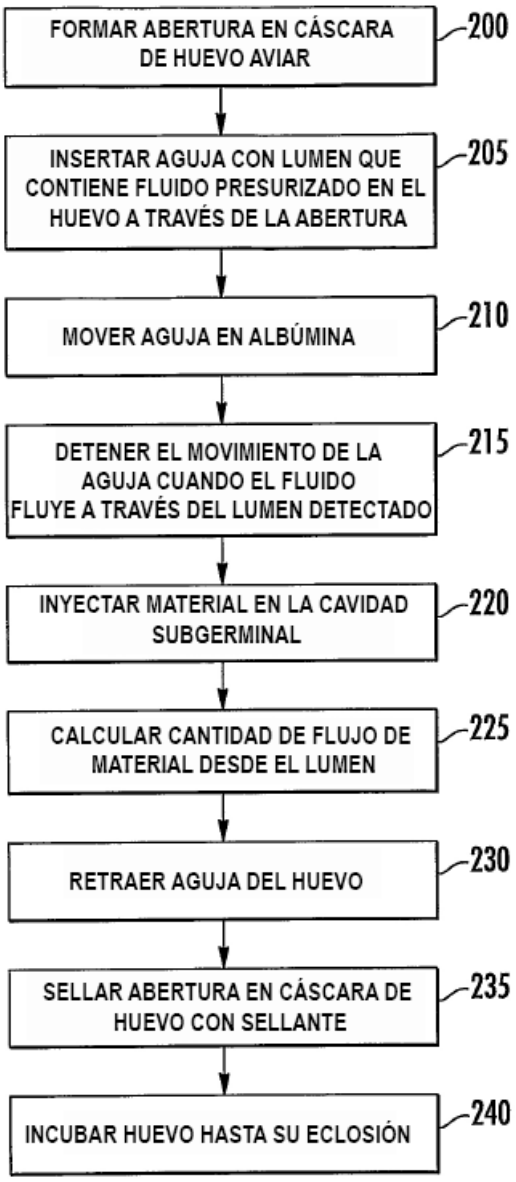
FORMAR ABERTURA EN CÁSCARA DE HUEVO AVIAR
200
INSERTAR AGUJA CON LUMEN QUE CONTIENE FLUIDO PRESURIZADO EN EL HUEVO A TRAVÉS DE LA ABERTURA
205
MOVER AGUJA EN ALBÚMINA
210
DETENER EL MOVIMIENTO DE LA AGUJA CUANDO EL FLUIDO FLUYE A TRAVÉS DEL LUMEN DETECTADO
215
INYECTAR MATERIAL EN LA CAVIDAD SUBGERMINAL
220
CALCULAR CANTIDAD DE FLUJO DE MATERIAL DESDE EL LUMEN
225
RETRAER AGUJA DEL HUEVO
230
SELLAR ABERTURA EN CÁSCARA DE HUEVO CON SELLANTE
235
INCUBAR HUEVO HASTA SU ECLOSIÓN
240

FIG. 5

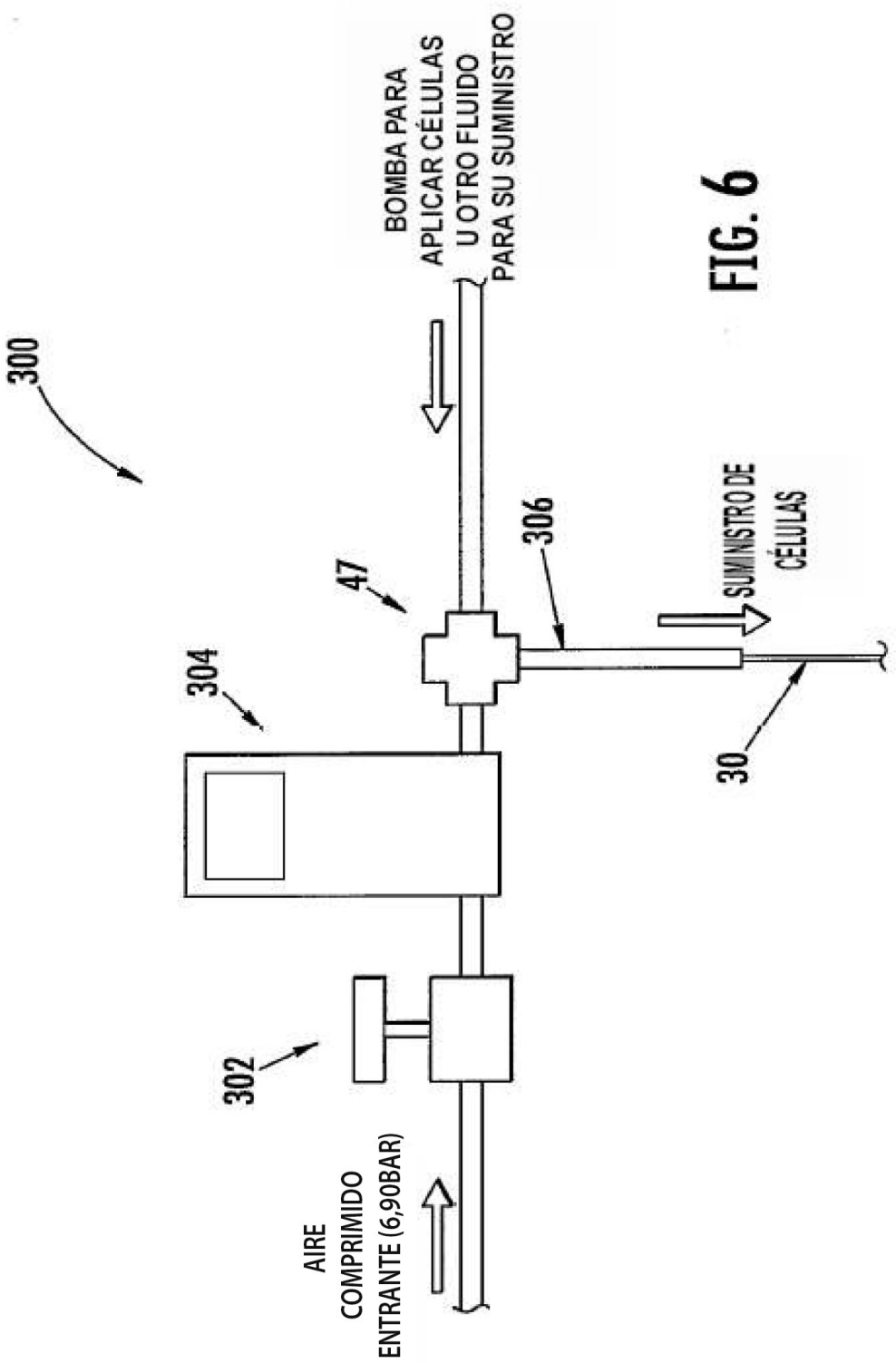
300
BOMBA PARA APLICAR CÉLULAS U OTRO FLUIDO PARA SU SUMINISTRO
47
306
SUMINISTRO DE CÉLULAS
304
30
302
AIRE COMPRIMIDO ENTRANTE (6,90BAR)

FIG. 6