

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 041**

51 Int. Cl.:

A61B 5/00 (2006.01)
A61D 7/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
A01K 45/00 (2006.01)
C12N 15/89 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2011 E 11802102 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2659274**

54 Título: **Procedimiento de control de una inyección de una composición luminiscente en un huevo aviar con fines de vacuna**

30 Prioridad:

27.12.2010 FR 1061278

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

13.10.2015

73 Titular/es:

**CEVA SANTE ANIMALE (100.0%)
10 Avenue de La Ballastière B.P. 126
33500 Libourne Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**MASSONNEAU, MARC y
MOGENET, LAURENT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 548 041 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

Procedimiento de control de una inyección de una composición luminiscente en un huevo aviar con fines de vacuna

1. Campo técnico de la invención

La invención se refiere al uso de compuestos aptos para emitir una señal luminiscente de en un huevo aviar.

5 La invención se refiere en particular al uso de estos biomarcadores en un procedimiento de detección y/o de cuantificación de fenómenos biológicos con fines de vacuna y/o terapéuticos y/o diagnósticos en un huevo aviar.

La invención está destinada de forma más particular al campo de la vacunación *in ovo*.

2. Antecedente tecnológico

10 La formación de imágenes ópticas gana popularidad en el campo biomédico con numerosas aplicaciones preclínicas y en seres humanos en campos tales como la investigación sobre el cáncer, para la detección de tumores o incluso en neurociencias, para la formación de imágenes del cerebro.

15 Por lo tanto, como se ha descrito en el documento de patente publicado con el número WO2008/025006 con respecto a ratones o animales pequeños, los fotones emitidos por la dispersión de las células marcadas por un compuesto luminiscente excitado por una luz se difunden a través de los tejidos de estos mamíferos. Incluso si esta serie de fotones difundidos se absorben, una fracción llega a la superficie en la que se pueden detectar con una cámara que registra en dos dimensiones (2D) la distribución espacial de los fotones emitidos por la superficie.

Sin embargo, incluso en el caso de una sonda fluorescente única en un ratón, la autofluorescencia tisular hace difícil una buena resolución.

En un intento de superar estas deficiencias, se han explorado dos temas principales :

- 20 - adaptación de dispositivos de formación de imágenes ópticas de acuerdo con las directrices que se describen en el documento de patente publicado con el número WO2007 144542 ;
 - adaptación de sondas luminiscentes : se han desarrollado números de sondas pero la atención de la solicitante se ha centrado más particularmente en los biomarcadores, tales como los que se escriben en el documento de patente publicado con el número WO2006/129036. Sin embargo, estas informaciones no permiten ni sugieren
 25 aplicar la formación de imágenes ópticas sobre huevos.

30 El documento de patente WO 2010/103111 enseña a los inventores que anticuerpos inyectables se marcan preferentemente con compuestos luminiscentes, tales como por ejemplo un grupo fluorescente o fosforescente. El documento de patente WO 2010/103111 se refiere a los procedimientos de determinación del sexo de los embriones. Este procedimiento comprende en particular la inyección de un anticuerpo marcado, que se fijará de forma específica a ciertos antígenos del embrión.

El documento de Patente de Estados Unidos Nº 4 458 630 desvela un procedimiento de vacunación *in ovo*, en particular mediante inyección de cepas de virus específicos. El documento de Patente de Estados Unidos Nº 5 028 421 desvela también un procedimiento de vacunación *in ovo*, en particular por inyección de interleuquina aviar.

3. Objetivos de la invención

Una de las aplicaciones preferentes de la invención se aplica a la vacunación *in ovo*.

40 Hasta el momento actual, se ha desarrollado una serie de técnicas para permitir que la vacunación *in ovo* de embriones, es decir, la vacunación de embriones mientras que estos últimos todavía se encuentran en el huevo. De hecho, se reconoce que estas vacunas *in ovo* permiten una reducción de los costes, una alta automatización de la vacunación, una reducción del estrés y aumenta la tasa de éxito en comparación con una vacunación de los pollos después de la eclosión.

45 Una de las dificultades de esta operación de vacunación *in ovo* reside en el control de la vacunación, pudiendo variar el tamaño del huevo de forma significativa. De hecho, un huevo fertilizado comprende una pluralidad de compartimentos distintos, a saber la cáscara exterior, la cámara de aire, el fluido alantoideo, el líquido amniótico y el embrión. Sin embargo, la vacunación solamente es eficaz si el producto se inyecta en el embrión o en el líquido amniótico.

En la práctica es difícil certificar que la inyección se realizó correctamente, en particular en las cadenas automatizadas de tratamiento huevos aviares, tales como las líneas de tratamiento de huevos de futuros pollos de engorde.

50

Una de las soluciones usadas normalmente en la actualidad consiste en mezclar el producto inyectado con un colorante y en tomar muestras de grandes cantidades de huevos en la cadena de vacunación para verificar la calidad de la inyección. Si el huevo sometido a ensayo de este modo se considera no conforme, entonces el dispositivo de inyección se vuelve a calibrar.

5 Uno de los inconvenientes de este procedimiento es que requiere la destrucción de varios cientos o miles de huevos, por lo tanto embriones, sin garantizar, no obstante, una buena reproducibilidad de la vacunación y requiere una puesta en marcha pesada en términos de personal y tiempo. Otro inconveniente unido a esta destrucción masiva de huevos es la imposibilidad de aplicar este procedimiento de forma rutinaria y el carácter invasivo que no es compatible con los patrones de automatización, de productividad y de bienestar.

10 También existe una necesidad de un procedimiento de control para poder garantizar que la vacunación y/o la extracción se realizan en condiciones óptimas.

Por lo tanto, la invención tiene como objeto solucionar al menos algunos de los inconvenientes de los procedimientos y dispositivos del estado de la técnica.

15 En particular, la invención tiene como objeto proporcionar un procedimiento para controlar la calidad de una inyección de producto en un huevo que no sea invasivo.

La invención también tiene como objeto proporcionar un procedimiento tal que su fiabilidad no éste solamente relacionada con un calibre de huevo.

La invención también tiene como objeto proponer un dispositivo para la realización de un procedimiento de acuerdo con la invención.

20 **4. Descripción de la invención**

El objeto de la presente solicitud está limitado por el objeto de las reivindicaciones 1-17. La solicitud se refiere a cualquier composición luminiscente inyectable en un huevo caracterizada porque comprende un compuesto apto para emitir una señal luminiscente (o fluorescente o autoluminiscente o quimioluminiscente) detectable en un huevo que forma biomarcador de un producto que tiene una actividad de vacuna, terapéutica o de diagnóstico.

25 Se observará que los compuestos luminiscentes de acuerdo con la solicitud usados para marcar un producto que tienen tal actividad de vacuna, se distinguen claramente de los anticuerpos marcados detectables por una excitación luminosa conocidos en la solicitud WO2010/103111 y usados para determinar *in ovo* el sexo de las especies aviares.

Por compuesto apto para emitir una señal luminiscente, se entiende todo compuesto que emite una radiación durante su paso de un estado estable a un estado excitado o viceversa.

30 De acuerdo con un modo de realización en particular, dicho compuesto luminiscente es el verde de indocianina que emitirá fotones después de someter al huevo a una fuente de excitación luminosa.

De acuerdo con una variante, la composición usada en el procedimiento comprende además un producto que tiene una actividad de vacuna.

35 La invención se refiere a un procedimiento de control de la inyección de un producto con fines de vacuna en un huevo, que comprende sucesivamente las etapas siguientes :

- inyección de una composición que comprende un producto que tiene una actividad de vacuna y un compuesto luminiscente que forman biomarcador de dicho producto que tiene una actividad de vacuna en un huevo ;
- detección de la señal emitida por el compuesto luminiscente a través de la cáscara del huevo ;
- tratamiento de la información recogida.

40 Por lo tanto, se trata claramente de un procedimiento de control de acuerdo con la invención que no es invasivo.

Además, como quedara más claro a continuación, la fiabilidad de un procedimiento de acuerdo con la invención es independiente del calibre del huevo analizado.

Además, es posible, por ejemplo, integrar un procedimiento de acuerdo con la invención sobre una cadena automática de vacunación.

45 La invención se encuentra, por lo tanto, en el uso de un compuesto luminiscente como marcador del producto inyectado en el huevo. En efecto, la solicitante ha descubierto que es posible detectar los fotones emitidos por el compuesto luminiscente, esto a pesar de la presencia de una barrera mineral, es decir, la cáscara del huevo.

De acuerdo con una solución ventajosa, el procedimiento comprende una etapa de correlación de la señal emitida por el compuesto luminiscente y de localización de la misma en el huevo.

50

De este modo se puede obtener una indicación clara y directa de la posición del producto inyectado en el huevo, y verificar si esta posición se adapta o no con respecto al efecto esperado del producto inyectado.

5 De acuerdo con una solución ventajosa, el procedimiento comprende una etapa de someter el huevo a una fuente de excitación luminosa necesaria para la detección de la señal. El compuesto luminiscente se excita de este modo por la fuente luminosa adaptada que se puede realizar preferentemente con la ayuda de un láser o de una fuente de excitación luminosa apropiada que comprende, en particular, los filtros adaptados a las longitudes de onda del luminóforo.

De acuerdo con una variante ventajosa, dicha etapa de someter el huevo a una fuente de excitación luminosa y dicha etapa de detección de la señal se realizan a ambos lados del eje de simetría de dicho huevo.

10 De forma ventajosa, dichas etapas de sometimiento y de tratamiento de la información recogida se realizan para al menos dos, preferentemente al menos tres, posiciones angulares distintas relativas entre el huevo y dicha fuente de excitación luminosa.

15 Estas posiciones angulares distintas se podrán obtener mientras que el huevo se pone en rotación sobre sí mismo. También se podrá tener en cuenta la obtención de estas posiciones manteniendo el huevo fijo y haciendo variar la posición de la fuente de emisión luminosa y/o la posición de los medios que sirven para el tratamiento de la información recogida.

De este modo, se puede obtener un conjunto de señales representativas de una « imagen » en tres dimensiones de la posición del compuesto luminiscente y por lo tanto de la del producto inyectado, en el huevo.

20 Las señales obtenidas de acuerdo con las diferentes posiciones también podrán formar parte del objeto de una selección con el fin de retener solamente la mejor señal a la vista de dicha etapa de correlación.

De acuerdo con una solución ventajosa, dicha etapa de detección de la señal se realiza con la ayuda de una cámara digital.

25 Del mismo modo, de acuerdo con la variante de la invención, dicha etapa de tratamiento de la información recogida se realiza solamente sobre la parte de la señal emitida por la parte superior del huevo que contiene la cámara de aire.

De acuerdo con un modo de realización en particular, el procedimiento comprende una etapa previa de modelado de la señal emitida por el compuesto luminiscente cuando se sitúa en cada una de las zonas siguientes del huevo :

- 30
- cámara de aire ;
 - líquido alantoideo ;
 - líquido amniótico ;
 - embrión.

En este caso, dicha etapa de análisis se realiza preferentemente con la ayuda de una unidad de tratamiento en la que se memorizan las señales modeladas obtenidas durante la etapa preliminar.

35 En este caso, el procedimiento comprende de forma ventajosa una etapa de comparación de la señal emitida por el compuesto luminiscente a través de la cáscara del huevo durante la etapa de análisis con las señales modeladas obtenidas durante la etapa preliminar.

De acuerdo con un primer enfoque de la invención, dicha etapa de inyección se realiza con el fin de inyectar de forma simultánea dicho producto a inyectar y dicho compuesto luminiscente.

40 De acuerdo con un segundo enfoque de la invención, dicha etapa de inyección se realiza con el fin de inyectar de forma separada dicho producto a inyectar y dicho compuesto luminiscente.

En este caso, dicho compuesto luminiscente es apto para su fijación sobre el producto.

En cualquier caso, se observa que el compuesto luminiscente está concebido para ocupar una posición en el huevo combinada con la del producto inyectado.

45 De acuerdo con un modo de realización en particular, dicho compuesto luminiscente es el verde de indocianina (N° CAS 3599-32-4) de fórmula general $C_{43}H_{47}N_2N_aO_6S_2$:



Preferentemente, este compuesto luminiscente es un compuesto de fórmula general del tipo : S-B-A o sus derivados, tales como sales, ésteres o derivados funcionalizados con elementos estructurales descritos y reivindicados en el documento de patente publicado con el número FR-2 886 292.

5 Un procedimiento de acuerdo con la invención se puede usar para controlar y/o cuantificar, en un huevo :

- una vacuna;

La solicitud también se refiere a un dispositivo para realizar etapas de sometimiento y análisis de un procedimiento de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende,

- 10
- una zona de recepción de al menos un huevo ;
 - opcionalmente al menos una fuente de excitación luminosa dirigida hacia dicha zona de recepción ;
 - medios de detección de la señal emitida por el compuesto luminiscente a través de la cáscara del huevo;
 - medios de tratamientos de la información recogida.

Preferentemente, dicha zona de recepción está montada de forma giratoria.

15 El dispositivo de acuerdo con la invención se podrá presentar en forma de un dispositivo autónomo y/o un dispositivo integrado en una cadena automatizada de tratamiento de huevos, tal como una cadena automatizada de vacunación.

5. Listado de figuras

Otros objetos, características y ventajas de la invención aparecerán con la lectura de la descripción siguiente proporcionada solamente con fines no limitantes y que se refiere a las figuras adjuntas, en las que :

- 20
- la figura 1 es una vista esquemática de un modo de realización de un dispositivo para realizar un procedimiento de acuerdo con la invención ;
 - las figuras 2 a 5 son vistas esquemáticas de diferentes señales emitidas por un compuesto luminiscente en el transcurso de un procedimiento de acuerdo con la invención ;
- 25
- la figura 6 es un conjunto de tres imágenes que corresponden a filmaciones con una cámara digital de un huevo sometido a una fuente de excitación luminosa (láser) y en la cámara de aire en la que se ha inyectado un compuesto luminiscente ;
 - la figura 7 es una imagen que corresponde a una filmación con una cámara digital de un huevo en la cámara de aire en la que se ha inyectado un compuesto luminiscente y en la que se asocia un eje vertical Y sobre el que se reparten N = 400 líneas horizontales;
- 30
- la figura 8 es un gráfico que traduce el reparto de la intensidad luminosa media (Unidad Arbitraria de intensidad relativa) de la imagen de la figura 7 de acuerdo con el eje vertical Y
 - las figuras 9 a 12 representan las imágenes y los gráficos de reparto de la intensidad luminosa de acuerdo con el eje vertical Y asociadas que constituyen señales moderadas para huevos en los que se ha inyectado el compuesto luminiscente respectivamente en la cámara de aire, el líquido alantoideo, el líquido amniótico y el embrión ;
- 35
- la figura 13 representa un gráfico de reparto de la intensidad luminosa asociada a un huevo en el que se ha inyectado un compuesto luminiscente;
 - la figura 14 representa el mismo gráfico que el de la figura 13 pero en el que se han identificado la integral de la curva llevada sobre el mismo corresponde la intensidad luminosa de la parte del huevo que contiene la cámara de aire (S1) y la integral de la curva llevada sobre el mismo que corresponde a la intensidad luminosa del resto del huevo (S1).
- 40

6. Descripción detallada de un modo de realización de la invención

En toda la descripción que sigue a continuación, se hace referencia al uso de un procedimiento de acuerdo con la invención para controlar la inyección de una vacuna en un huevo.

45 Aplicado al control de la inyección de una vacuna, un procedimiento de acuerdo con la invención comprende las etapas siguientes :

- inyección de una composición que comprende una vacuna y un compuesto luminiscente que forma biomarcador de dicha vacuna en un huevo ;
- someter el huevo a una fuente de excitación luminosa ;
- detectar y analizar la señal emitida por el compuesto luminiscente a través de la cáscara del huevo.

5 En el contexto del modo de realización que se describe aquí, el compuesto luminiscente es el compuesto de fórmula $C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$ denominado normalmente verde de indocianina (N° CAS 3599-32-4). Se evaluó otro compuesto denominado FR99, que se describe y se reivindica en el documento de patente publicado con el número FR-2 886 292 y los resultados no presentes confirman las observaciones realizadas con el verde de indocianina. Estos compuestos son químicamente inertes con respecto a la vacuna. Las propiedades biológicas de la composición que incluye el compuesto luminiscente son ligeramente las mismas que las de la vacuna.

10 Un procedimiento de acuerdo con la solicitud se puede realizar, por ejemplo, con un dispositivo tal como el que se ilustra en la figura 1.

Tal como el que aparece sobre esta figura, un dispositivo para la realización de un procedimiento de control de una inyección de vacuna en un huevo comprende :

- 15 - una zona de recepción 1 de un huevo 10 ;
- un láser 2, cuyo haz se puede dirigir hacia la zona de recepción, y de forma más precisa hacia el huevo 10 ;
- en la sede que constituye una fuente de excitación luminosa del compuesto luminiscente inyectado en el huevo ;
- una cámara digital 3, que constituyen medios de detección de la señal emitida por el compuesto luminiscente a través de la cáscara del huevo ;
- 20 - una unidad de tratamiento 4, destinada a recibir y a tratar los datos proporcionados por la cámara digital 3.

Tal como se representa en la figura 1, la zona de recepción se coloca entre el láser 2 y la cámara digital 3. Se observa que no es necesario que el láser, la zona de recepción y la cámara digital estén alineados entre sí.

La zona de recepción 1 está montada de forma giratoria alrededor de un eje vertical (tal como se ilustra con la flecha curvada F1), y está acoplada a medios de accionamiento giratorios (no se representan).

25 Previamente, en la fase de control de la vacunación con la ayuda de un dispositivo tal como se ha descrito anteriormente, se realiza una etapa de modelado de la señal susceptible de emisión por el compuesto luminiscente inyectado en el huevo, bajo excitación luminosa, para cada una de las zonas siguientes del huevo :

- la cámara de aire ;
- el líquido alantoideo
- 30 - el líquido amniótico ;
- el embrión.

Por lo tanto, durante esta etapa previa de modelado, el compuesto luminiscente reacciona a la excitación luminosa y proporciona, a través de la cáscara, a la vuelta, una señal entre las que se ilustran en las figuras 2 a 5.

35 Por lo tanto, cuando el compuesto luminiscente se sitúa en la cámara de aire, se obtiene una zona 20 luminosa tal como se ilustra en la figura 2, que coincide ligeramente con el volumen de la cámara de aire.

Cuando el compuesto luminiscente se sitúa en el líquido alantoideo, se obtiene una zona 30 luminosa tal como se ilustra en la figura 3, que coincide ligeramente con el volumen del saco alantoideo.

Cuando el compuesto luminiscente se sitúa en el líquido amniótico, se obtiene una zona 40 luminosa tal como se ilustra en la figura 4, que coincide ligeramente con el volumen ocupado por el líquido amniótico.

40 Cuando el compuesto luminiscente se sitúa en el embrión, se obtiene una zona 50 luminosa, tal como se ilustra en la figura 5, que coincide ligeramente con el volumen ocupado por el embrión (que por supuesto varía en función de su etapa de desarrollo).

Por lo tanto, estas zonas 20, 30, 40, 50 se modelan para proporcionar datos de forma informática que se memorizan en la unidad de tratamiento 4.

45 Cuando un huevo se somete al procedimiento de control de acuerdo con la invención con la ayuda de un dispositivo tal como el que se ha descrito anteriormente, la vacuna y el compuesto luminiscente se inyectan en los huevos.

50 Esta etapa se puede realizar de un modo tal que la inyección de la vacuna y la inyección del compuesto luminiscente se realicen de forma simultánea. Por lo tanto, se deduce de ello que el compuesto luminiscente se sitúa en la misma forma que la vacuna, siendo inyectados la vacuna y el compuesto luminiscente de forma conjunta, es decir combinados.

También es posible inyectar de forma separada la vacuna y el compuesto luminiscente. En este caso, el compuesto luminiscente tiene una composición química preparada para que reaccione con la de la vacuna de un modo tal que

el compuesto luminiscente se va a colocar en la misma zona del huevo que la vacuna (lo que también puede ser el caso incluso si el compuesto luminiscente se indica de forma simultánea con la vacuna). Las composiciones químicas del compuesto luminiscente y de la vacuna se pueden preparar de un modo tal que el compuesto luminiscente se fije sobre la vacuna.

5 Por lo tanto, los huevos a controlar se someten a los rayos del láser 2, realizándose entonces el análisis de la señal emitida por el compuesto luminiscente a través de la cáscara del huevo por la cámara digital 3. La imagen captada por la cámara digital 3 se proporciona en forma de datos numéricos en la unidad de tratamiento 4 que realiza una etapa de correlación de la señal emitida por el compuesto luminiscente y de localización de la misma en el huevo.

10 Para esto, la unidad de tratamiento realiza una etapa de comparación de la señal emitida por el compuesto luminiscente a través de la cáscara del huevo, proporcionada por la cámara digital, con las señales modeladas obtenidas durante la etapa previa siendo realizada en los datos memorizados representativos por ejemplo de las figuras 2 a 5.

15 Por supuesto, la unidad de tratamiento se configura para realizar el control en forma de un ensayo : en función del producto inyectado, se espera que la inyección del mismo se realice en una zona precisa del huevo y si los datos representativos de la posición del producto inyectado en el huevo (estos datos se obtienen gracias al compuesto luminiscente) no corresponden a los datos de una posición moderada, el control es negativo. Por supuesto, si existe una correspondencia entre las dos posiciones, el resultado es positivo.

20 Para aumentar la fiabilidad del procedimiento de acuerdo con la invención, es posible someter el huevo a una excitación luminosa y analizar la señal emitida por el compuesto luminiscente para al menos dos posiciones angulares del huevo (alrededor de su eje vertical) con respecto a los rayos del láser. Preferentemente, el control se realiza mientras que la zona de recepción 1 se pone en rotación (estando preparada la zona de recepción para que la rotación de la zona de recepción arrastre a la del huevo alrededor de su eje vertical).

25 El procedimiento de acuerdo con la invención se ha sometido ensayo con el fin de poner en evidencia su relevancia para controlar la inyección de una vacuna. Los principales resultados de estos diferentes ensayos realizados se presentan a continuación en referencia a las figuras 6 a 14.

Determinación de la concentración óptima de compuesto luminiscente y de la duración óptima de adquisición de la señal

30 24 huevos fecundados a los 18,5 días de incubación fueron el objeto de una inyección *in ovo* de una solución de verde de indocianina a diferentes concentraciones, que corresponden de forma razonable a una solución de vacuna marcada con un marcador luminiscente. Se sometieron a ensayos diferentes duraciones y adquisición de las señales recogidas en formas de imagen por la cámara 3.

En total, se analizaron 720 imágenes. Este análisis permitió poner en evidencia que :

- la concentración óptima de compuesto luminiscente (C_{opt}) es de 50 micromoles por litro ;
- la duración óptima de adquisición de la señal (T_{opt}) es de 90 segundos.

35 Modelado de las señales

A continuación se realizaron ensayos para modelar señales emitidas por el compuesto luminiscente cuando se inyecta en cada una de las zonas siguientes de un huevo :

- la cámara de aire,
- el líquido alantoideo,
- 40 - el líquido amniótico,
- el embrión.

A este efecto, los huevos que presentan tiempos de fecundación diferentes, es decir : 17 ; 17,5 ; 18 ; 18,5 y 19 días de incubación, fueron el objeto de la inyección de verde de indocianina a la concentración óptima (C_{opt}) determinada anteriormente.

45 Para cada tiempo de fecundación, la inyección se realizó a diferentes profundidades de inyección, es decir : en la cámara de aire de un huevo, en el líquido alantoideo de un segundo huevo, en el líquido amniótico de un tercer huevo y en el embrión de un cuarto huevo.

50 Para cada uno de estos juegos, se tomaron tres imágenes, antes y después de la inyección, con la cámara 3 para la duración de la adquisición óptima (T_{opt}) de acuerdo con tres posiciones relativas distintas del huevo con respecto a la cámara 3 y al rayo láser 2. Estas tres posiciones distintas estuvieron haciendo girar el huevo sobre sí mismo alrededor de su eje de simetría de 120 ° la continuación de nuevo de 120 °.

Las imágenes tomadas de este modo con la cámara 3 se trataron a continuación con la unidad de tratamiento 4.

En primer lugar, este tratamiento consistió en tratar la señal con el fin de eliminar el ruido generado por la luz coherente que atraviesa el huevo y que no resulta de la presencia del verde de indocianina. En la práctica, la señal obtenida después de la inyección se restó de la señal obtenida antes de la inyección, y esto para cada huevo, para cada posición y para cada profundidad de inyección.

5 La figura 6 muestra la imagen (A) obtenida para un huevo en una posición dada antes de la inyección del producto luminiscente, la imagen (B) obtenida para el mismo huevo en la misma posición después de la inyección del producto en su cámara de aire a la concentración óptima que se ha definido anteriormente, y, la imagen tratada (C) obtenida por tratamiento de las señales que corresponden a las imágenes (A) y (B) habiendo consistido en restar de la señal correspondiente a la imagen (B) la señal correspondiente a la imagen (A).

10 Para cada huevo, las tres imágenes tratadas (C) obtenidas para las tres posiciones mencionadas anteriormente se analizaron a continuación. En referencia a la figura 7, este análisis consistió en realizar para cada imagen una serie de medidas de la intensidad luminosa y en hacer una media por línea, de altura en la parte baja de la imagen de acuerdo con el eje Y, con el fin de obtener un reparto de la intensidad luminosa media de acuerdo con este vegetal como se indica, para un ejemplo, en la figura 8. En la práctica, se realizaron 400 medidas por imagen (que corresponden a 400 líneas horizontales de las imágenes) es decir 1200 medidas por huevo.

15 Para cada huevo, entre las tres imágenes tratadas y analizadas, se seleccionó la imagen tratada que muestra la intensidad luminosa media más elevada, que se traduce al máximo de la presencia del producto fluorescente.

20 Por lo tanto, se pudieron obtener modelos de señales emitidas por el compuesto luminiscente cuando se inyectó en cada una de las zonas siguientes del huevo : cámara de aire, líquido alantoideo, líquido amniótico, embrión. Estas señales modeladas y las imágenes correspondientes se representan en las figuras 9, 10, 11 y 12 respectivamente. Cada una de ellas indica la intensidad luminosa media relativa (Unidad Arbitraria de intensidad relativa) (eje de ordenadas) detectada en función de un número N de líneas, en el caso 400, traduciendo la altura del huevo de acuerdo con su eje vertical desde su vértice (eje de abscisas).

25 Como se puede observar sobre estas figuras 9 a 12, cada modelo presenta un perfil bien particular. En referencia a la figura 13, una intensidad de luminiscencia global media se puede asociar de este modo a cada compartimento del huevo. Por lo tanto, la señal que se detectará si se tratara de acuerdo con la invención para un huevo que ha sido objeto de una inyección de un producto, tal como por ejemplo una vacuna, y de producto luminiscente, se podrá comparar fácilmente con uno de estos modelos con el fin de determinar en qué parte del huevo en cuestión se produjo realmente la inyección.

30 En este sentido, la forma de estos perfiles indica también que se podrá prever la limitación de la etapa de comparación en la parte de la señal emitida por la parte superior del huevo que contiene la cámara de aire y por lo tanto no tratar más que esta parte de la señal en vista de dicha comparación.

35 En referencia a la figura 14, también se observa aquí en cada señal se puede asociar una relación $S1/S2$ que traduce la proporción de luminiscencia emitida por la parte del huevo que corresponde ligeramente a la que contiene la cámara de aire, con respecto a luminiscencia emitida por el resto del huevo. Por lo tanto, en referencia a la figura 15, una proporción de superficie media se puede asociar también a cada compartimento del huevo. Esta proporción también se podrá usar para ayudar en la determinación de la parte del huevo en la que realmente se produjo la inyección.

Correlación

40 Con el fin de validar la correlación entre las imágenes adquiridas y la localización real de la solución inyectada, se realizó un ensayo en sesenta huevos que presentaban tiempos de fecundación diferentes, es decir: 17 ; 17,5 ; 18 ; 18,5 y 19 días de incubación (12 huevos por tiempo).

45 Para realizar esto, 60 huevos de embriones con el tiempo indicado recibieron una inyección doble (compuesto luminiscente y colorante de color azul) localizada de forma aproximadamente equilibrada entre los 4 compartimentos. Después de un examen óptico del huevo en los 3 ángulos seguido de un descascarillado completo del huevo (que permite la caracterización de la colocación del colorante de color azul) se generaron a la vez, y para cada huevo, los datos ópticos de intensidad y de localización precisa de la inyección.

Este ensayo permitió confirmar que las imágenes adquiridas gracias al procedimiento de acuerdo con la invención estaban estrechamente correlacionadas con la localización real de la solución inyectada en el huevo.

50

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de control de una inyección de un producto con fines de vacuna en un huevo aviar, que comprende sucesivamente las etapas siguientes :
 - 5 - inyección de una composición que comprende un producto que tiene una actividad de vacuna y un compuesto luminiscente que forma un biomarcador de dicho producto que tiene una actividad de vacuna en un huevo;
 - detección de la señal emitida por el compuesto luminiscente a través de la cáscara del huevo;
 - tratamientos de la información recogida.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho compuesto luminiscente es un compuesto fluorescente o autoluminiscente o quimioluminiscente.
3. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** dicho compuesto luminiscente es el verde de indocianina o sus derivados, tales como sales, ésteres o derivados funcionalizados con elementos estructurales.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** dicho compuesto luminiscente es de tipo S-B-A o sus derivados, tales como sales, ésteres o derivados funcionalizados con elementos estructurales.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** comprende una etapa de correlación de la señal emitida por el compuesto luminiscente y de localización de la misma en el huevo.
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** comprende una etapa de someter el huevo a una fuente de excitación luminosa necesaria para la detección de la señal.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** la fuente de excitación luminosa está adaptada a las longitudes de onda del compuesto luminiscente.
- 25 8. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, **caracterizado porque** la fuente de excitación luminosa es un láser o cualquiera de los filtros adaptados a las longitudes de onda del compuesto luminiscente.
9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** comprende una etapa previa de modelado de la señal emitida por el compuesto luminiscente cuando se sitúa en cada una de las zonas siguientes del huevo :
 - 30 - cámara de aire,
 - líquido alantoideo,
 - líquido amniótico,
 - embrión.
- 35 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque** dicha etapa de análisis es realizada con la ayuda de una unidad de tratamiento en la que se memorizan las señales modeladas obtenidas durante dicha etapa preliminar.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** comprende una etapa de comparación de la señal emitida por el compuesto luminiscente a través de la cáscara del huevo durante la etapa de detección con las señales modeladas obtenidas durante dicha etapa preliminar.
- 40 12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** dicha etapa de inyección es realizada con el fin de inyectar de forma simultánea dicho producto a inyectar y dicho compuesto luminiscente.
13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** dicha etapa de inyección es realizada con el fin de inyectar de forma separada dicho producto a inyectar y dicho compuesto luminiscente.
- 45 14. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13, **caracterizado porque** dicho compuesto luminiscente es apto para su fijación sobre el producto.
15. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, **caracterizado porque** dicha etapa de someter el huevo a una fuente de excitación luminosa y dicha etapa de detección de la señal son efectuadas a
 - 50 ambos lados del eje de simetría de dicho huevo.

16. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, **caracterizado porque** dichas etapas de sometimiento y de tratamiento de la información recogida son efectuadas para al menos dos, preferentemente al menos tres, posiciones angulares distintas relativas entre el huevo y dicha fuente de excitación luminosa.
- 5 17. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, **caracterizado porque** dicha etapa de tratamiento de la información recogida es efectuada solamente sobre la parte de la señal emitida por la parte superior del huevo que contiene la cámara de aire.

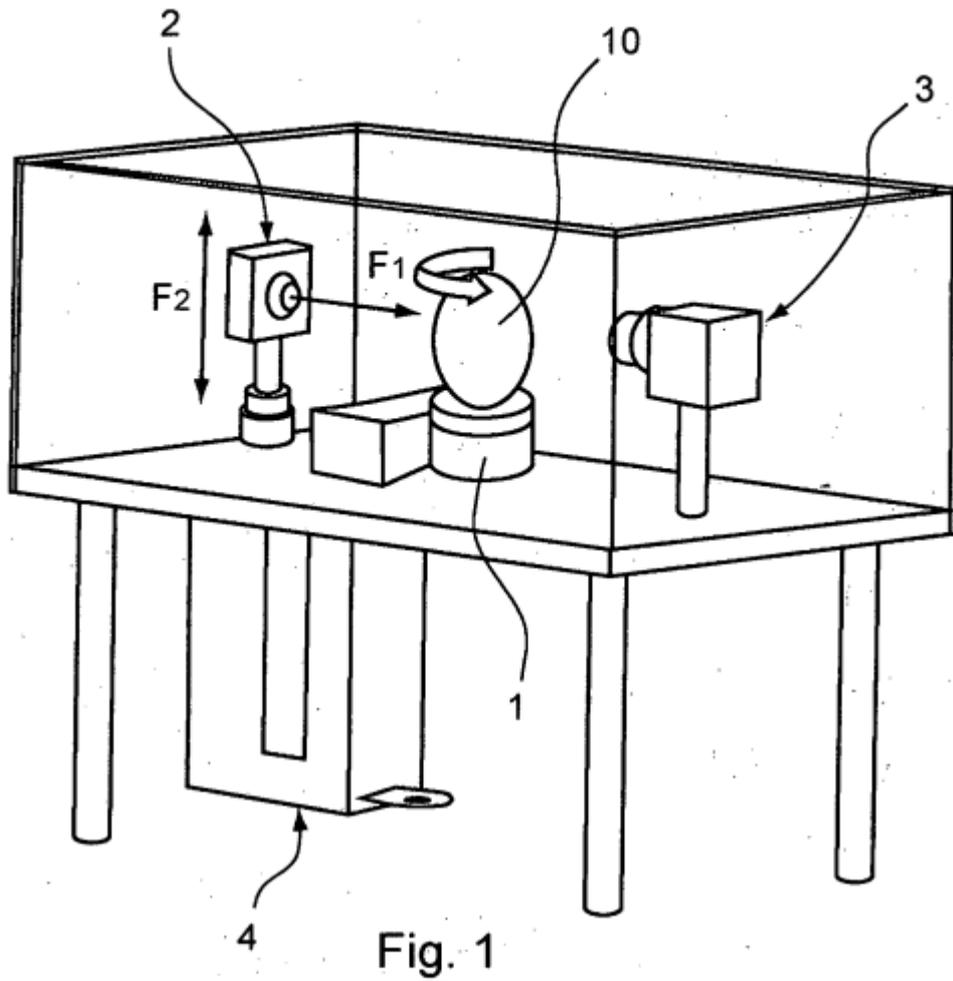


Fig. 1



Fig. 2

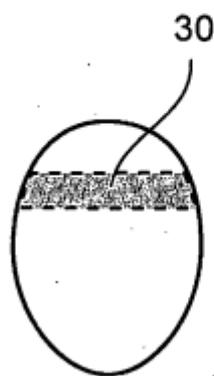


Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5

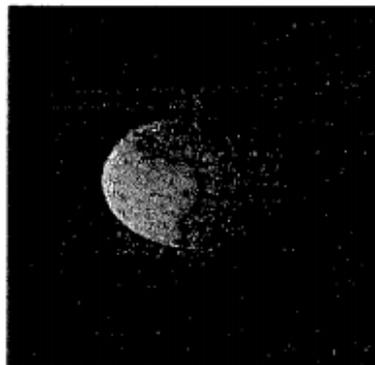
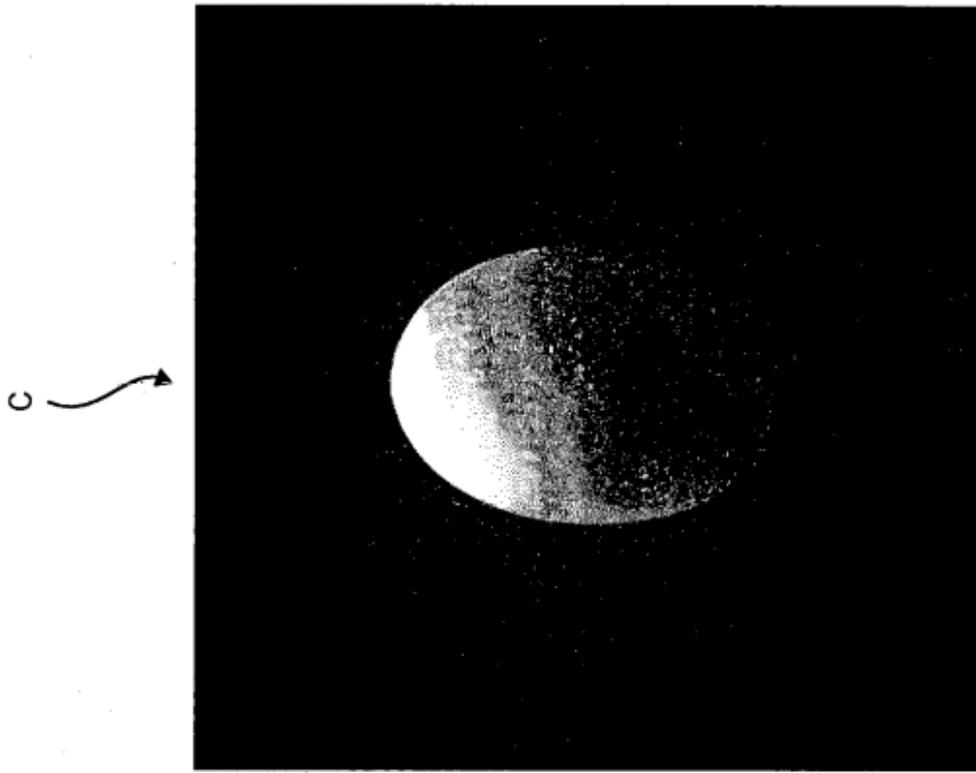


Fig. 6

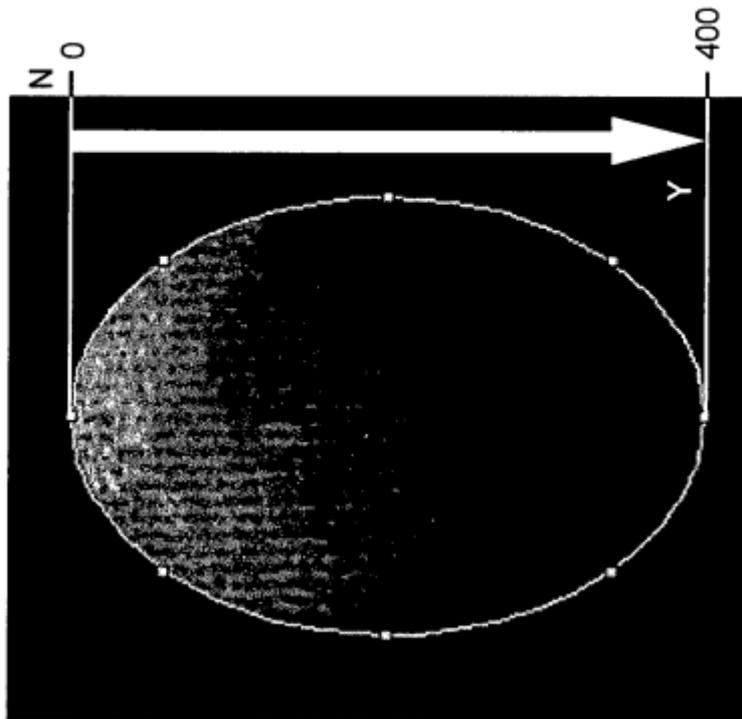


Fig. 7

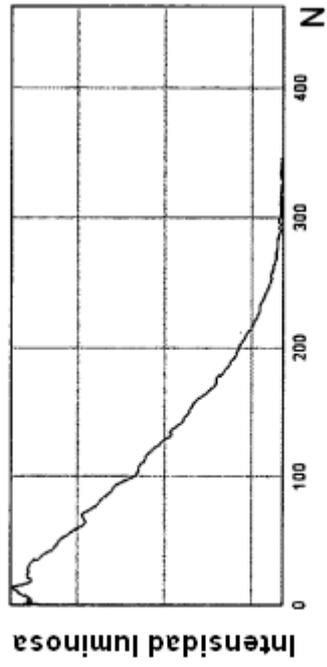


Fig. 8

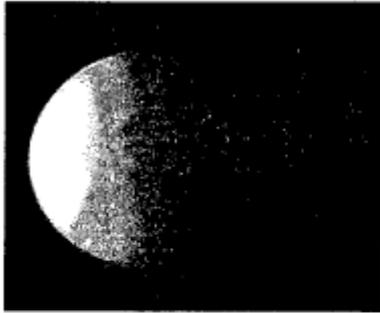
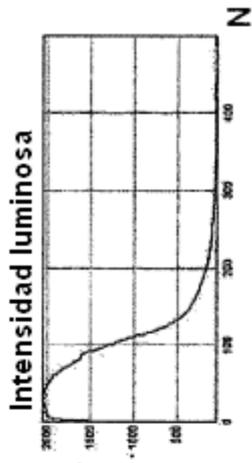


Fig. 10

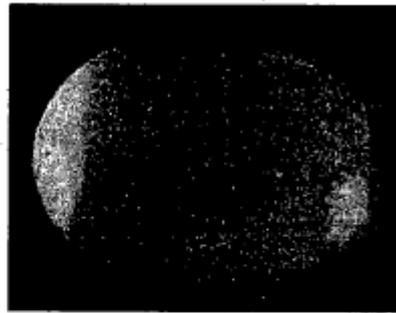
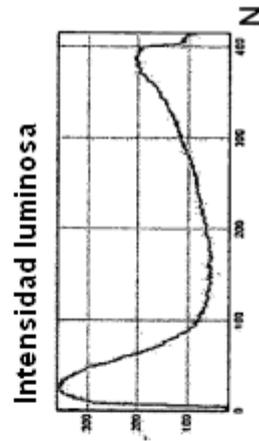


Fig. 12

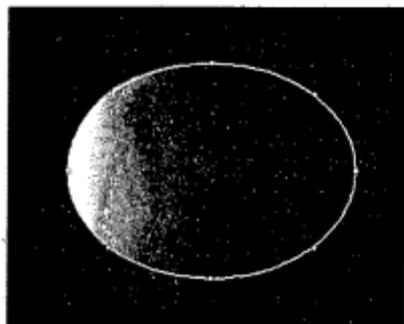
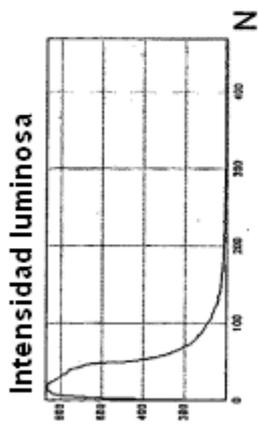


Fig. 9

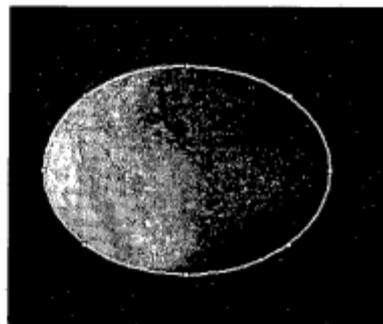
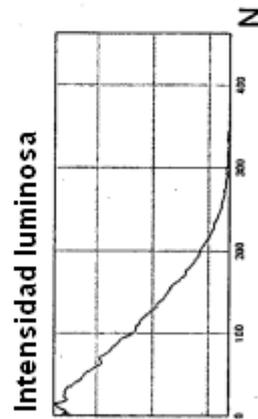


Fig. 11

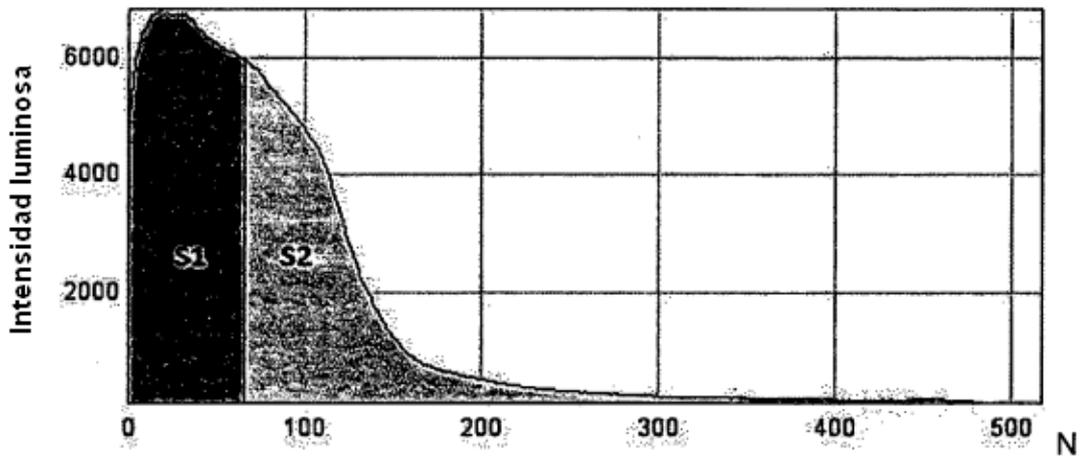
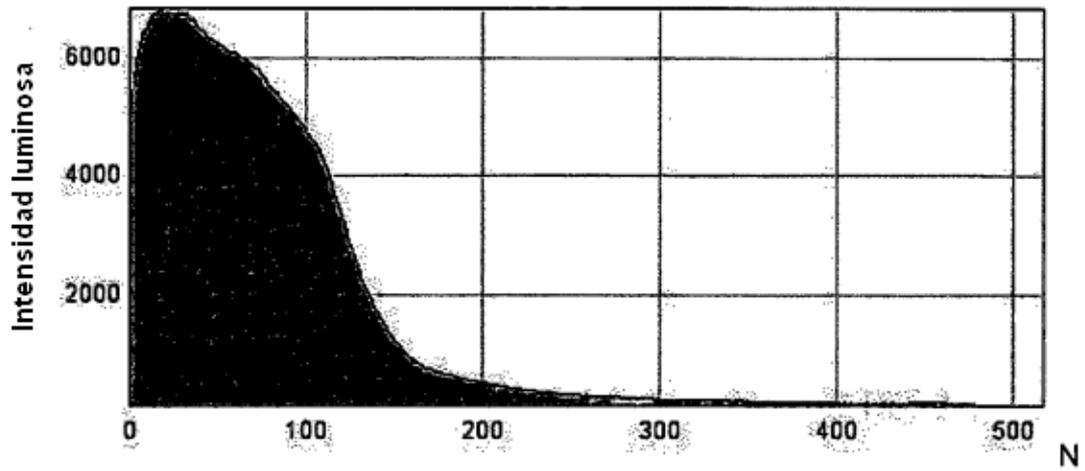


Fig. 14