(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 675 194**

(51) Int. Cl.:

G01N 21/3581 (2014.01)
G01N 33/08 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2013** **PCT/DE2013/000784**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014** **WO14086335**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2013** **E 13828974 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018** **EP 2926129**

(54) Título: **Método para la determinación del sexo de embriones de ave en huevos de ave a través de la cáscara ópticamente opaca**

(30) Prioridad:

03.12.2012 DE 102012023947

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.07.2018

(73) Titular/es:

LEIBNIZ-INSTITUT FÜR PHOTONISCHE TECHNOLOGIEN E.V. (100.0%)
Albert-Einstein-Strasse 9
07745 Jena, DE

(72) Inventor/es:

MAY, TORSTEN;
WEBER, KARINA y
POPP, JÜRGEN

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 675 194 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

Método para la determinación del sexo de embriones de ave en huevos de ave a través de la cáscara ópticamente opaca

[0001] La invención se refiere a un método y una disposición para la identificación no destructiva, no invasiva de características moleculares específicas y/o biológicas de una estructura interior de un objeto de investigación biológico mediante una barrera impermeable óptica, según la especie de las reivindicaciones, en forma de un procedimiento y un dispositivo para la determinación del sexo de embriones de ave *in ovo*, en el cual no se deben abrir los envolventes de los huevos de ave de investigación.
La determinación de género del ser vivo, particularmente de aves se conoce desde hace tiempo y puede producirse de forma distinta.
Además de la pura observación externa de las características fenotípicas del ser vivo, como por ejemplo pájaros, se vienen realizando desde hace tiempo también investigaciones de hormonas y de ADN, para determinar el sexo de estos.
Así, divulga por ejemplo la DE 697 11 943 T2 un método para la determinación del sexo de un pájaro *in ovo*, en el cual la existencia o falta de una hormona específica de sexo (estrógeno) en el líquido extracelular del huevo de ave se usa para la determinación del sexo.
En este caso, se guia una aguja o un biosensor a través de la cáscara abierta (orificio) en una zona objetivo adecuada (por ejemplo. saco alantónico), para extraer una muestra de fluido del huevo o medir el contenido en hormona *in ovo* (por ejemplo, espectroscópico).
El método según la DE 697 11 943 T2 tiene la desventaja de que la determinación del sexo de embriones de aves, que se puede realizar también *in ovo*, no es no destructiva.
A través de la abertura de la cáscara del huevo se daña la barrera de protección natural del embrión (protección contra influencias microbianas, químicas y mecánicas), lo que puede llevar a dañarse o a su muerte.

[0002] De la DE 10 2007 013 107 A1 se conoce un método, por el cual el sexo de los animales se puede determinar de la manera más sencilla, rápida y segura posible, así como sin perjucio considerable y problemático para el animal por motivos de protección para este (por ejemplo, mediante aturdimiento).
Con este método, el ADN (o proteínas) de material celular del ave que se determina el sexo se examina con luz y se miden las vibraciones moleculares y/o esqueléticas del ADN (y de las proteínas).
Las bandas vibracionales esenciales para la determinación del sexo se encuentran a este respecto en la zona de recuento celular por debajo de 1800 cm^{-1}.
El espectro de luz resultante de ADN se detecta por las vibraciones moleculares y/o esqueléticas y se compara con el espectro de referencia prefijado de una base de datos.
De esta comparación se consigue una asignación de género basada en el contenido de ADN del material celular del pájaro.
Este procedimiento se aplica particularmente, para determinar por medio de características externas el sexo no reconocible o no suficientemente reconocible de aves, precisamente *in ovo*.
Para ello, se obtiene pluma de ave del eje de la pluma del ave ya incubada del huevo como material celular.
A continuación, se lleva a cabo una derivación de diferentes espectros de Raman de resonancia ultravioleta diferente de la pluma de ave (captación de las vibraciones moleculares del ADN), que lleva a métodos de clasificación vigilados o no vigilados conocidos.
Alternativamente, para el material celular en forma de pulpa de pluma según la divulgación DE 10 2007 013 107 A1 también es posible focalizar en pájaros no incubados luz de exploración mediante un acceso pequeño (un orificio) a través de la cáscara directamente sobre el blastodermo como material celular.

[0003] Esto tiene sin embargo la desventaja de que no es no destructiva la determinación del sexo de embriones de ave *in ovo*.
A través de la abertura de la cáscara de huevo se produce un daño de la barrera de protección natural del embrión (protección frente a influencias micróbicas, químicas y mecánicas), lo que puede llevar a dañarse o a su muerte.
Particularmente, para la cría y tenencia de aves de granja a gran escala, como por ejemplo pollos o pavos, esta desventaja lleva a que este método según la DE 10 2007 013 107 A1 no se pueda llevar a cabo en la prática.

[0004] La DE 10 2010 006 161 A1 divulga un método y un dispositivo para la determinación del sexo de huevos de ave no incubados y fecundados, donde un huevo presenta una cáscara de huevo resistente, una yema rodeada por la cáscara y otros envolventes y un blastodermo asignado a la yema y donde se realiza un orificio a través de la cáscara en dirección al blastodermo con células de disco embrionario.
En este caso, se realizarán los siguientes pasos del proceso:

- Posicionamiento de la sonda en el área del blastodermo
- Caracterización espectroscópica *in ovo* de las células de disco embrionario e
- Identificación del sexo por una clasificación automática de espectros.

[0005] Según la DE 10 2010 006 161 A1 se utiliza como sonda un cristal óptico, se realiza con la recepción rápida y sin realimentación de un espectro infrarrojo y/o espectro de infrarrojos próximo con el uso de una reflexión total debilitada dentro del cristal óptico a través de un campo evanescente en el área del blastodermo, donde se produce la extinción a consecuencia de una absorción espectral de células de disco embrionario específicas de sexo.
Este procedimiento tiene igualmente la desventaja, de que no es no destructiva la determinación del sexo de embriones de ave *in ovo*.

[0006] A esto se añade, que este procedimiento posee la desventaja adicional de que debe ser usado un cristal óptico.

[0007] Se sabe además, que la espectroscopia se realiza en el rango de frecuencias de terahercios entre 0,1THz y 10THz, donde particularmente se obtienen en la parte del espectro ampliada entre 0,025 y 100THz espectros tanto en el procedimiento de absorción como en el de reflexión (véase para ello por ejemplo GB 2,372,930 y GB 2,347,835).

[0008] Particularmente, también es posible, mediante el método de pulso ultracorto temporal conseguir informaciones tridimensionalmente (tomográficas) sobre el objeto de investigación (véase para ello por ejemplo la WO 2003042670 A1).

[0009] En la US 7,612,341 se describe la posibilidad especial de analizar tejido humano en reflexión espectral, para diagnosticar en sujetos de prueba un cáncer de mama.

[0010] De la DE 10 2007 031 959 A1 se conoce una videocámera de terahercios, que sin embargo no se puede utilizar para la determinación del sexo.

[0011] La determinación no invasiva del sexo, los embriones de ave suponen todavía actualmente un problema sin resolver.
Aunque diversos métodos principalmente pueden determinar material genético en términos de sexo, ninguno de los métodos establecidos puede llevar a cabo esta determinación a través de una cáscara no abierta.

[0012] La tarea de la invención consiste por consiguiente en indicar un método y una disposición, que evite las desventajas citadas previamente del estado de la técnica, en el que la identificación invasiva de características químicas y/o biológicas de una estructura interna a través una barrera ópticamente opaca del objeto de investigación, se lleva a cabo la toma de material de muestra directamente en la estructura interior, donde penetra el objeto de investigación en una medida significativa sin introducir radiación ionizante.
En este caso, se puede influir lo menos posible y/o no destruir ni dañar la estructura interna eventualmente viva del objeto de investigación.

[0013] Esta tarea se consigue mediante un método de acuerdo con la reivindicación 1.
Configuraciones ventajosas de la invención se indican en las reivindicaciones secundarias.
El carácter de la invención consiste en analizar mediante la tecnología de terahercio una barrera ópticamente opaca de un objeto de investigación a través de una estructura interna con características dieléctricas diferentes mediante análisis volumétrico electromagnético y mediante estos datos estructurales analizados del objeto de investigación conseguir mediante análisis espectral electromagnético una medición apropiada de un espectro de un ámbito seleccionado de manera intencionada de la estructura que se analiza, para encontrar sin toma de muestras del interior del objeto de investigación afirmación sobre características específicas moleculares y/o biológicas de la estructura interior.

[0014] El requisito para la interpretación del espectro de THz medido en un objeto de la invención no preparado adicionalmente es el conocimiento fundamental sobre la estructura general del objeto en vistas de estratificaciones de sustancias con características dieléctricas diferentes, porque reflexiones de superficies límites y dispersiones modifican el espectro total recuperado de forma significativa.

[0015] Para lograr esta precognición sobre las sustancias presentes en el objeto y cuya de disposición y/o sucesión estratigráfica posible, se obtienen los datos y/o las características dieléctricas del objeto por las mediciones de laboratorio en muestras preparadas (e.d. en muestras sin barrera ópticamente opaca) en la parte del espectro relevante.

[0016] Particularmente, con muestras en forma de huevos de ave en caso de empleo para cada huevo, se determina la posición del blastodermo, que contiene el material genético analizable, en el pre-campo de la medición en sí, para luego realizar la medición espectral en el lugar exacto sin proceso de ajuste que requiere mucho tiempo, de forma no destructiva en el propio objeto de investigación.

[0017] Utilizando los conocimientos previos sobre las características específicas moleculares y/o biológicas analizables de la estructura interior se analizan mediante un procedimiento disuelto los plazos de circulación de

reflejos de THz, que se producen a través de las superficies límites diferentes, para generar un modelo de localización exacta de la estructura de capa real en el objeto de investigación.

[0018] Para esta detección del modelo de volumen del objeto de investigación, se pueden usar alternativamente también procedimientos de medición similares de THz en una parte del espectro ampliada de 0,01 a 1.
Puesto que en esta gama de frecuencias y/o en el análisis de sexo de huevos de ave fecundados no se puede obtener ninguna información espectral del material genético, es idóneo este rango espectral amplio sin embargo únicamente para la inspección de la posición exacta de la estructura interior.
El análisis verdadero del material genético debe ocurrir en este caso después del posicionamiento preciso del objeto de investigación en la zona de THz.

[0019] El modelo de volumen de la estructura de capa a base de datos materiales conocidos sirve por consiguiente para analizar como referencia, para el espectro integral medido de la prueba examinada del objeto de investigación.
De este tipo, los componentes que no forman parte realmente de la prueba en el espectro total determinado se pueden extraer y/o los componentes conocidos se pueden cuantificar.

[0020] La medición verdadera del espectro integral en la zona de THz se realiza a través de la captación paralela de señales con frecuencias diferentes como respuesta a una iluminación de banda ancha, posiblemente homogénea tras la descomposición dispersiva mediante un sistema de línea de detectores de banda ancha.

[0021] Los detectores se pueden enfriar para conseguir la sensibilidad máxima y con ello el tiempo de medida unido mínimo.

[0022] El procedimiento de medición según la invención comprende dos procedimientos de medición independientes para el análisis de estructura (detección del modelo de sólidos) y la medición del espectro integral (de la prueba en sí).

[0023] La detección del modelo de sólidos se realiza por un método para el análisis estructural por una barrera ópticamente opaca de un objeto de investigación biológico, donde un estructura interna con características dieléctricas diferentes se analiza mediante análisis espectral electromagnético, en el que el objeto de invetigación se posiciona en una red de transmisores de impulsos y receptores, que están dispuestos al mismo nivel y conectados con un sistema informático que transmite datos e información.
Por radiaciones de transmisor de impulsos electrónicas se envían pulsos electromagnéticos en el rango espectral 0,01 a 1 THz sobre el objeto de investigación colocado.
La radiación que parte del objeto de investigación la recogen los destinatarios electrónicos y se envía al ordenador mediante conexiones que transmiten datos e información para un procedimiento electrónico, por medio de ello, los datos de imagen se evalúan de forma automática y asistida por ordenador y se clasifican las coordenadas espaciales en 3D, donde estos datos de imagen se comparan con los datos de una base de datos de parámetros de material espectrales, que fueron obtenidos previamente por las mediciones de laboratorio de las características dieléctricas en muestras del objeto de investigación sin barrera ópticamente opaca en la parte del espectro relevante.

[0024] Las coordenadas espaciales en 3D, que se pueden representar de manera gráfica, controlan una unidad de posicionamiento en las direcciones espaciales Y-Z-X.

[0025] La medición del espectro integral de la prueba en sí se realiza a través de un método para la clarificación estructural por una barrera ópticamente opaca de un objeto de investigación biológico, en el que el obejto de investigación se posiciona mediante la unidad de posicionamiento en un paso del procedimiento adicional, la iluminación homogénea, de banda ancha emitida por una fuente de rediación, de una frecuencia en el rango de 0,1 a 10 THz atraviesa las coordenadas espaciales (X,y,z) de una estructura interna específicamente molecular y/o biológica clarificable y se captan los espectros de THz emitidos por un receptor de línea.
Alternativamente, también es posible, que frente al objeto de investigación un cabezal de medición colocado a través de la unidad de posicionamiento en el espacio con fuentes de radiación está dispuesto en un paso del procedimiento, de tal manera que la iluminación homogénea de banda ancha emitida de las fuentes de radiación, de una frecuencia en el rango de 0,1 a 10 THz de las coordenadas espaciales (X,y,z) penetra una estructura interior químicamente y/o biógicamente analizable y se aceptan los espectros de THz de esta forma emitidos mediante un receptor de línea.
Se efectúan los siguientes pasos:

1) Estructura de la base de datos de parámetro del material

[0026] Antes de la realización de la medición en sí se determinan los parámetros del material de las sustancias de huevo de ave bajo condiciones de laboratorio.
Para ello, se pueden tomar muestras aleatorias de la respectiva carga de exámen, que proporcionan además de parámetros posiblemente exactos también indicaciones sobre la fluctuación de la carga respectiva.

2) Análisis de estructura

[0027] Cada objeto de investigación con barrera ópticamente opaca, e.d. un huevo de ave pasa una estación de medición con un método de magen a base de pulsos electromagnéticos en el rango espectral de 0,01 - 1 THz, por lo cual se determinan la estructura de capa precisa del objeto de investigación, e.d. del huevo de ave, así como la posición actual de la estructura química y/o biológicamente analizable (e.d. el blastodermo) (ilustración 1).
Los datos de imagen se evalúan automáticamente y sirven en el paso próximo para el posicionamiento preciso del cabezal de medición con respecto a la estructura química y/o biológicamente analizable para el análisis espectral en sí.

3) Medición espectral

[0028] Para la medición del espectro integral se posiciona un cabezal de medición (ilustración 2), compuesto por una fuente de iluminación potente en el rango espectral 0,1 - 10 THz y un espectrómetro compacto robótico frente a la estructura analizable, de tal manera que la estructura previamente localizada posiciona el blastodermo en un huevo de ave) con una sección transversal posiblemente grande en el foco de radiación.
En el resultado de la medición espectroscópica en la zona de THz surge un espectro integral, que consiste en la superposición de los espectros de todos los componentes iluminados de la estructura del blastodermo).

4) Evaluación

[0029] Para la extracción del espectro individual relevante de la estructura (e.d. del material genético del blastodermo), a base del parámetro del material previamente analizado y del modelo de sólidos, se calculan espectros de los componentes individuales del objeto de investigación (e.d. del huevo de ave) y se sustraen del espectro integral medido.
A base de algoritmos de software adaptativos se mejora el modelo dentro de una carga.
Para el extremo de la medición de una carga (>1000 objeto de investigación, por ejemplo huevos de ave) se evalúa el volumen de datos y se analiza con métodos estadísticos con la condición de las características específicas que se esperan (e.d. específicas de sexo).

[0030] Los dos procedimientos de medición previamente presentados para la determinación del modelo de volumen con medición sucesiva de la señal integral de la prueba en sí se pueden utilizar para la determinación del sexo de embriones de aves, en el que los espectros de absorción de THz determinados por el receptor de línea se comparan con espectros de referencia informatizados mediante métodos de clasificación del análisis de datos estadísticos matemáticos y quimiométricos, para determinar el sexo.

[0031] En base a este examen, es posible determinar el sexo de los embriones de ave con una velocidad relevante para la práctica (aplicación industrial) a través de la cáscara de huevo no abierta, así como la membrana y la clara de huevo con ayuda de cuantificación de la firma espectral de THz del ADN del blastodermo.
Para ello, el material celular del blastodermo (el ADN) del embrión del ave del que se determina el sexo se analiza con radiación de THz mediante el envolvente intacto, en el que se miden las vibraciones moleculares, se detecta el espectro de las vibraciones moleculares y se compara con las estructuras de ADN específicas de sexo prefijadas de los espectros de referencia que representan el tipo de ave analizable y se realiza una clasificación de sexo del embrión de ave de esta comparación espectral.
La comparación del espectro de absorción de THz determinado con el espectro de referencia se produce en este caso de forma informatizada con métodos quimiométricos, matemáticos y estadísticos para el análisis mediante métodos de clasificación ya conocidos.

[0032] Para la realización del proceso de investigación de THz según la invención, se aplica una disposición de fuente de THz potente y técnica de detección altamente sensible, que para el análisis de estructura (paso 2 del procedimiento) consiste en una red de transmisores de impulsos y destinatarios, que está dispuesta al mismo nivel y está conectada a un sistema informático que transmite datos e información, donde un objeto de la investigación ópticamente opaco es posicionable debajo de la red.
Para la realización del proceso de investigación de THz según la invención se utiliza una disposición de fuente de THz potente y técnica de detección altamente sensible, que para la medición espectral (paso 3 del procedimiento) consta de un cabezal de medición, una fuente de iluminación, un elemento difractivo, un receptor de línea, un refrigerador (que es opcional) y un dispositivo de posicionamiento, mediante el cual el cabezal de medición se puede colocar en frente de una posición de medición marcada de un cuerpo de investigación.
La invención se explica sucesivamente con más detalle mediante un ejemplo de ejecución y las figuras.
En este caso, muestran:
Fig. 1: una representación esquemática de una forma de realización de una de disposición para el análisis estructural (paso 2 del procedimiento)

Fig. 2: una representación esquemática de una forma de realización de una disposición para la medición espectral (paso 3 del procedimiento) y
Fig. 3: una representación esquemática en conjunto de la interconexión del paso 2 y 3 del procedimiento.

[0033] La forma de realización representada en la Fig. de la de disposición comprende una técnica de detección activa altamente sensible en forma de una red (11) de transmisores de impulsos y destinatarios, que están dispuestos al mismo nivel y unidos a un sistema informático (12) que transmite datos e información, donde se puede colocar un objeto de la invención ópticamente opaco bajo la red.
La forma de realización representada en la Fig. 2 de la disposición comprende una fuente de THz potente, técnica de detección altamente sensible en forma de un cabezal de medición (2), que comprende una fuente de iluminación (3), un difractivo elemento (4), un destinatario de línea (5) y un refrigerador (6)
[que es opcional], y un dispositivo de posicionamiento (7), mediante el cual el cabezal de medición (2) se puede posicionar de forma dimensional en frente de una posición de medición marcada de un cuerpo de investigación (1),
[e.d. el blastodermo de un embrión de ave] en dirección 3- de Y-Z-X.
Durante todo el procedimiento de medición se extiende un destello de medición de la fuente de iluminación (3) sobre el cuerpo de investigación (1) en forma del blastodermo de un embrión de ave.
De este cuerpo de investigación (1) se extiende la trayectoria luminosa además del elemento difractivo (4) para el receptor de línea (5).

Posicionamiento de un blastodermo de un embrión de ave para la preparación de un análisis de THz sucesivo espetroscópico de absorción de este blastodermo mediante la disposición; representada en la figura 1 para el análisis estructural

[0034] Antes de la realización del posicionamiento en sí y la medición se determinan los parámetros del material de las sustancias de huevo de ave bajo condiciones de laboratorio.
Para ello, se pueden tomar muestras aleatorias de la carga de huevos de ave respectivos para examinar, que además de los posibles parámetros exactos también proporcionan indicaciones sobre la fluctuación de la carga respectiva.

[0035] El posicionamiento del objeto de investigación se realiza en un huevo de ave, que contiene un blastodermo de un embrión de ave.
Para ello, el huevo de ave se fija (1) sobre el soporte (8), de modo que su posición frente al soporte (8) no es alterable.
Tras la fijación, el huevo de ave (1) se radia a través de una red (11) con radiaciones de transmisor de impulsos electrónicas con una frecuencia en el rango de 0,01 a 0,1 THz para la absorción y en ella se mide simultáneamente la radiación emitida del huevo de ave (1) con destinatarios electrónicos mediante la red (1).
Los datos de medición determinados por la red (11) con destinatarios se transmiten al sistema informático (12), que se evalúan mediante un procedimiento temporal los plazos de circulación de los reflejos individuales en diferentes superficies límite y se crea un modelo de volumen reconstruido de la estructura de capa real del huevo de ave (1) mediante estos datos.
En este caso, se determinan las coordenadas espaciales (X,y,z) del blastodermo y como posición de medición marcada se almacenan en el sistema informático (12).

Análisis de THz espectroscópico de absorción del blastodermo para la asignación del sexo de embrión de ave mediante la disposición representada en la figura 2 para la medición del espectro

[0036] Los análisis de THz espectroscópicos de absorción se llevan a cabo de forma ejemplar en un blastodermo previamente colocado.
Para ello, sirve la posición de medición marcada almacenada en el sistema informático de las coordenadas espaciales (X,y,z) del blastodermo para el posicionamiento robótico del cabezal de medición (2) sobre el huevo de ave (1), en el que el cabezal de medición (2) a través del dispositivo de posicionamiento (7) mediante los datos de posicionamiento del sistema informático (12), que está conectado con el dispositivo de posicionamiento (7) que transmite datos, se mueve sobre el huevo de ave (1), hasta que la radiación de medición enviada de la fuente de iluminación (3) en forma de una iluminación posiblemente homogénea de banda ancha de una frecuencia en el rango de 1 a 10 THz sobre la posición de medición marcada de las coordenadas espaciales (X,y,z) del blastodermo incide con la sección transversal lo más amplia posible y la radiación emitida de esta posición de medición mediante el elemento difractivo (4) incide en el receptor de línea (5) como detector de banda ancha y allí se produce un espectro integral (véase para ello la figura 3: representación en conjunto esquemática de la interconexión).
El elemento difractivo (4) puede estar configurado como retículo de difracción microfabricado, que descompone de forma espectral la luz reflectante del huevo de ave (1) y la reproduce en la asignación meta de sensores enfriados supraconductores del receptor de línea (5).

[0037] Como referencia a los datos espectrales incidentes sobre el receptor de línea (5), se utiliza un modelo de la estructura de capa de datos espectrales conocidos de un blastodermo, donde mediante del sistema

informático (12) se analiza el espectro integral medido de la posición de medición examinada de las coordenadas espaciales (X,y,z) del blastodermo.
Para la extracción del espectro individual relevante del material genético del blastodermo, mediante del sistema informático (12) a base del material de parámetro preanalizado y del modelo de volumen, se calculan espectros de los componentes individuales del huevo de ave y se sustraen del espectro integral medido.
A base de algoritmos de software adaptativos se mejora el modelo dentro de una carga.
Para el final de la medición de una carga (>1000 huevos de ave), se evalúa el volumen de datos y se analiza con métodos estadísticos con la condición de las características específicas de sexo que se esperan.
La comparación del espectro de absorción de THz de sexo específico determinado calculado del espectro integral con el espectro de referencia conocido "masculino" o "femenino" se realiza en este caso mediante el sistema de ordenador (12) informatizado con métodos quimiométricos, matemáticos, estadísticos para el análisis de datos mediante métodos de clasificación ya conocidos.
La ventaja del procedimiento según la invención y el dispositivo según la invención consiste en que una identificación no invasiva de características químicas y/o biológicas de una estructura interior de un objeto de investigación es posible por una barrera impermeable ópticamente, sin destruir la barrera.

[0038] Esto es especialmente ventajoso, cuando el objeto de investigación es un huevo de ave, en el cual no se debe abrir el envolvente para llevar a cabo una determinación de género del embrión de ave rodeado del huevo *in ovo* sin una sonda que pasa a través de la cáscara de huevo.
Todas las características representadas en la descripción y las reivindicaciones sucesivas pueden ser esenciales de la invención tanto individualmente, como también en cualquier combinación entre sí.

Lista de referencias

[0039]

1	- Objeto de investigación (por ejemplo. huevo de ave)
11	- Red de transmisores de impulsos y destinatarios
12	- Envolvente ópticamente opaco del objeto de investigación (por ejemplo. cáscara del huevo de ave)
13	- Modelo de volumen reconstruido
14	- PC
2	- Cabezal de medición
3	- Fuente de iluminación
4	- Elemento difractivo
5	- Receptor de línea
6	- Refrigerador (opcional)
7	- Dispositivo de posicionamiento
x,y,z	- Coordenadas espaciales
Y-Z-X	- Direcciones espaciales 3D

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación de sexo de embriones de aves en huevos de avees a través de la cáscara de huevo ópticamente opaca, en la cual el material genético analizable en el blastodermo se clarifica mediante análisis espectral electromagnético, **caracterizado por el hecho de que**

- en un paso 1 el huevo de ave está situado bajo una red de transmisores de impulsos y destinatarios, que están dispuestos al mismo nivel y conectados un sistema informático para transferir datos e información donde mediante el transmisor de impulso se emiten pulsos electromagnéticos en el rango espectral de 0,01 a 1 THz a través de la cáscara de huevo ópticamente opaca al huevo de ave y simultáneamente la radiación reflejada por el huevo de ave y que atraviesa la cáscara de huevo ópticamente opaca se mide y se transmite al sistema informático mediante conexiones de transmisión de datos e información, donde mediante el ordenador se crea un modelo de volumen del huevo de ave reconstruido con coordenadas espaciales 3 D (X,y,z) y a continuación
- en un paso 2 un emisor de banda ancha electromagnético se coloca mediante las coordenadas espaciales 3 D (X,y,z) determinadas en el primer paso por un dispositivo de posicionamiento robóticamente frente al blastodermo genéticamente analizable, de tal manera que se emiten olas electromagnéticas a través de la cáscara de huevo ópticamente opaca en el rango espectral 0,01 a 10 THz sobre el blastodermo genéticamente analizable y se recibe la radiación que parte del blastodermo y va a través de la cáscara de huevo ópticamente opaca por un destinatario espectral y se transmite al sistema informático mediante las conexiones que transmiten datos e información, donde el espectro integral del blastodermo genéticamente analizable determinado con el destinatario se evalúa por ordenador automáticamente y se compara con los datos de los parámetros del material espectral de una base de datos, que fueron obtenidos previamente por las mediciones de laboratorio de las características dieléctricas en muestras de huevos de avees sin cáscara de huevo ópticamente opaca en el rango espectral relevante.

2. Método para la determinación de sexo de embriones de ave en huevos de avees a través de la cáscara de huevo ópticamente opaca según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** las coordenadas espaciales 3 D (X,y,z) se representan de manera gráfica.

3. Método para la determinación de sexo de embriones de ave en huevos de avees a través de la cáscara de huevo ópticamente opaca, según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** se controla la unidad de posicionamiento en las direcciones espaciales Y-Z-X.

4. Método para la determinación del sexo de embriones de aves en huevos de avees a través de la cáscara de huevo ópticamente opaca según la reivindicación 3, **caracterizado por el hecho de que** el huevo de ave examinable se posiciona en el espacio a través del dispositivo de posicionamiento en el paso 1 del procedimiento, de tal manera que la iluminación homogénea de banda ancha con una frecuencia en el rango de 0,1 a 10 THz, emitida de una fuente de radiación las coordenadas espaciales (X,y, z) en el paso 2 del procedimiento atraviesa el blastodermo genéticamente analizable del huevo de ave y los espectros de THz emitidos se reciben por un receptor de línea.

5. Método para la determinación de sexo de embriones de aves en huevos de avees a través de la cáscara de huevo ópticamente opaca según la reivindicación 3, **caracterizado por el hecho de que** un cabezal de medición colocado en el espacio frente al huevo de ave a través del dispositivo de posicionamiento con fuentes de radiación en el paso 1 del procedimiento está dispuesto de tal manera que la iluminación homogénea de banda ancha, emitida de la fuente de radiación, de una frecuencia en el rango de 0,1 a 10 THz de las coordenadas espaciales (X,y,z) penetra el blastodermo genéticamente examinable en el segundo paso del procedimiento y se aceptan los espectros de THz emitidos por un receptor de línea.

6. Aplicación de un procedimiento según una o varias de las reivindicaciones anteriores 1 a 5 para la determinación de sexo de un embrión de ave en un huevo completamente cerrado, en el que mediante el paso 1 del procedimiento se determina una zona determinada del blastodermo genéticamente analizable de un embrión de ave, cuyas coordenadas espaciales (X,y, z) se almacenan en el sistema informático para marcar la posición de medición y se usan para el accionamiento del cabezal de medición para el examen de absorción electroscópica de THz sucesivo, donde en el paso 2 del procedimiento, el espectro determinadamente integral de la posición de medición se compara con espectros de referencia informatizados mediante métodos de clasificación estadísticos matemáticos quimiométricos del análisis de datos, para determinar el sexo de los embriones de avees.

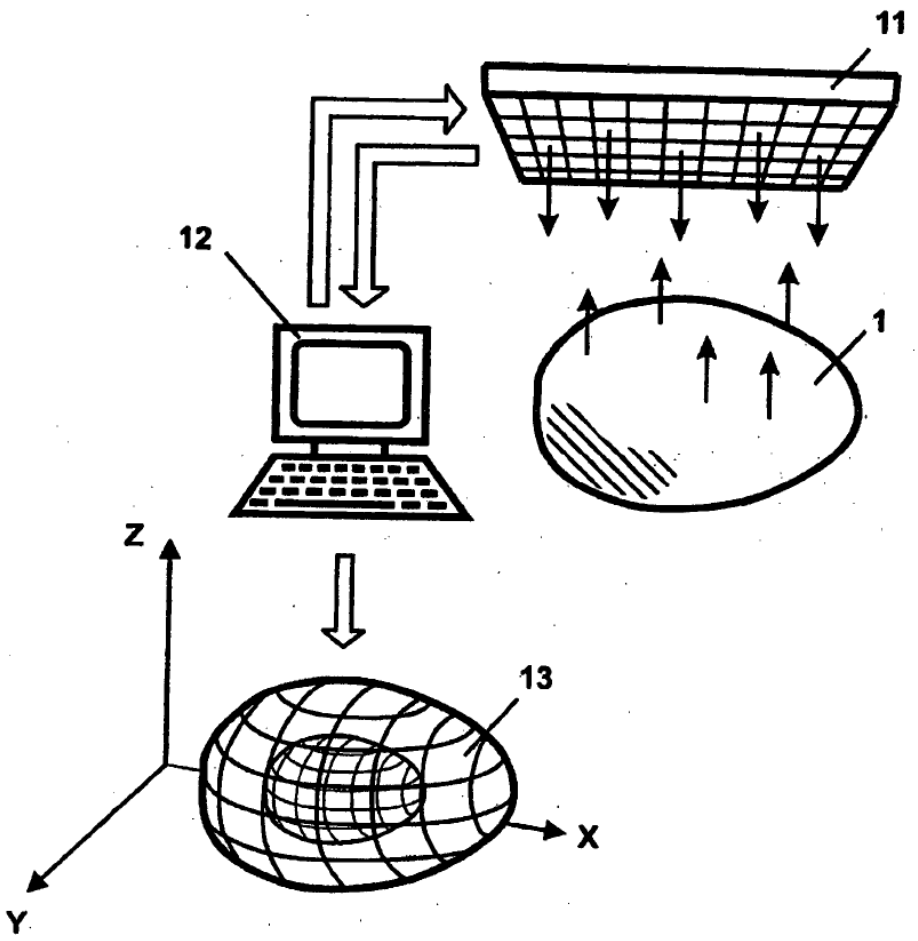

Fig. 1

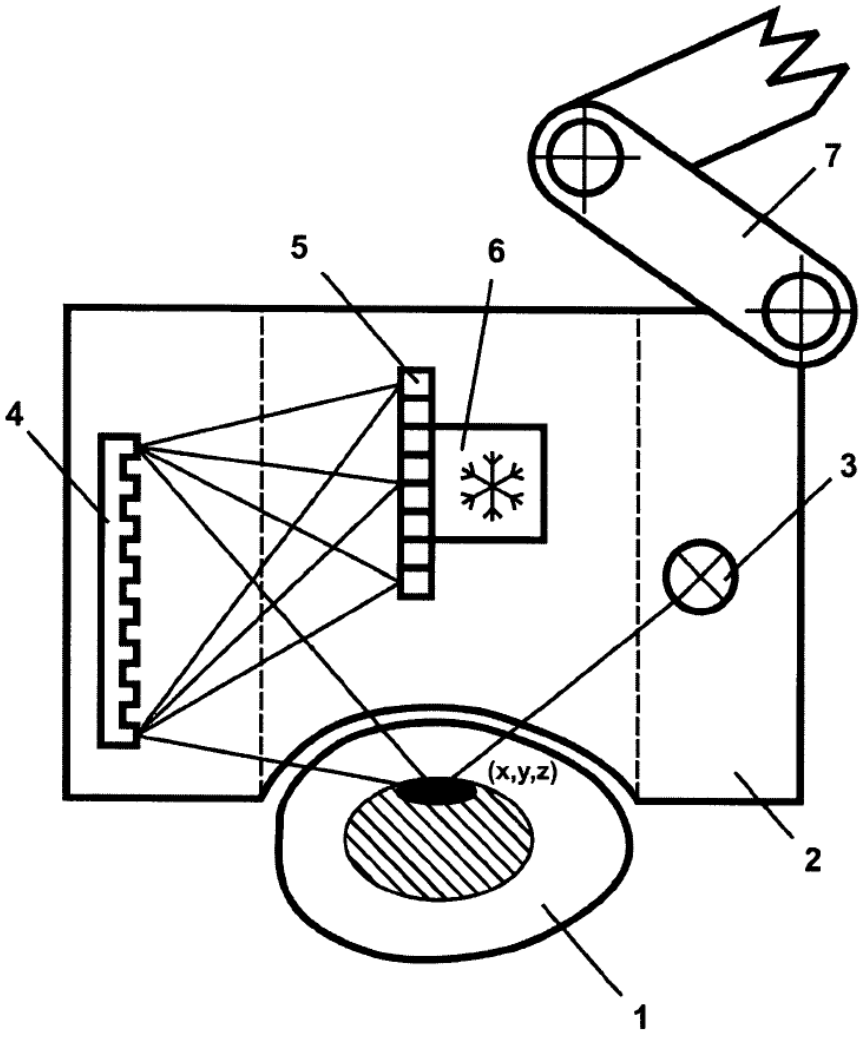

Fig. 2

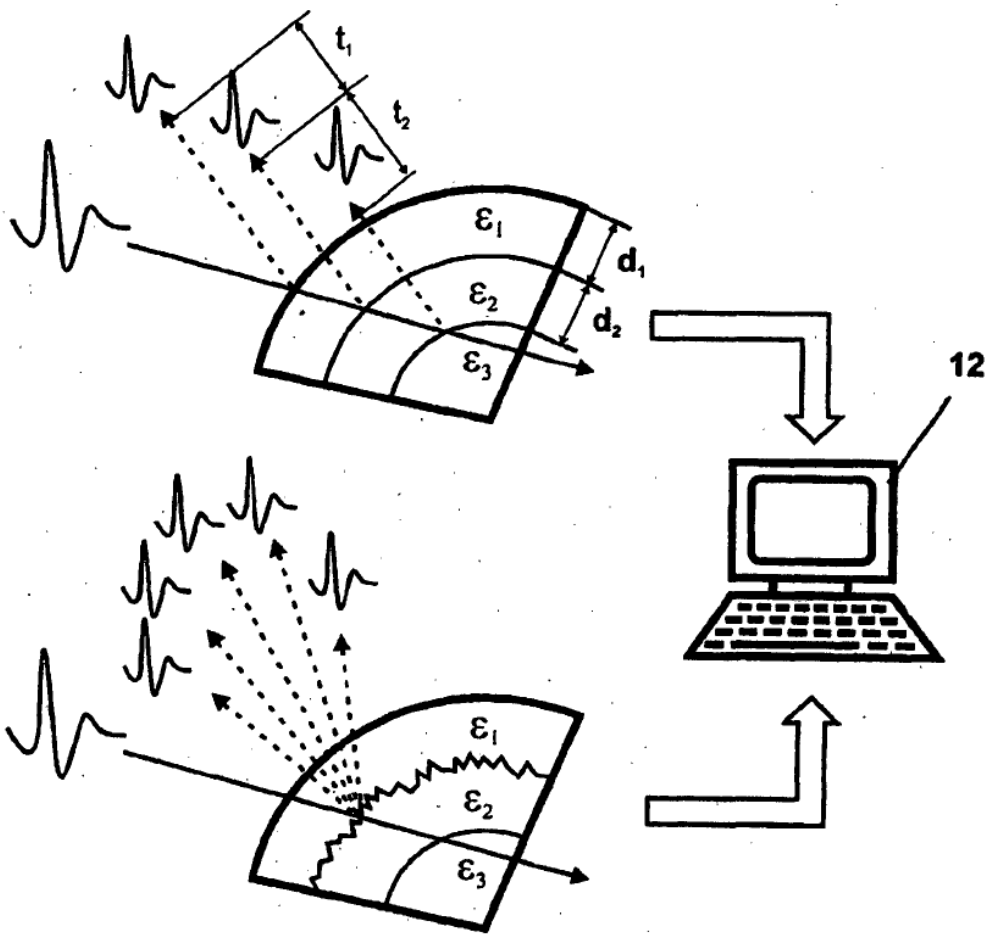

Fig. 3