

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 027**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2013 PCT/NL2013/050569**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14021715**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2013 E 13747889 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2880440**

54 Título: **Determinación de género, viabilidad y/o etapa de desarrollo de embriones aviares in ovo**

30 Prioridad:

**30.07.2012 NL 2009256**  
**30.07.2012 US 201261677227 P**  
**30.07.2012 NL 2009255**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.04.2019**

73 Titular/es:

**IN OVO B.V. (100.0%)**  
**J.H. Oortweg 19**  
**2333 CH Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**BRUINS, WOUTER SEBASTIAAN y**  
**STUTTERHEIM, WIL MARIJN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 709 027 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**

Determinación de género, viabilidad y/o etapa de desarrollo de embriones aviarios in ovo

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para la determinación del género; y/o etapa de desarrollo de un embrión aviar en óvulos, determinando la presencia de marcadores de desarrollo en el huevo más específicamente en el fluido alantoico. El presente proceso se refiere además a un proceso para la selección de huevos masculinos y femeninos, y a la producción de vacunas y/o polluelos que usan estos huevos seleccionados.

## Antecedentes de la invención

Los huevos fertilizados de la mayoría de las especies aviares, en particular los criados comercialmente, como el pollo domesticado (*Gallus gallus domesticus*), los patos, gansos y pavos tienden a resultar en la eclosión en una distribución casi igual de pollos machos y hembras. En la gestión de incubación, puede ser conveniente separar las aves según varias características, en particular el género. Por ejemplo, puede ser conveniente inocular aves macho y hembra con diferentes vacunas, o separar las poblaciones para obtener eficiencias de alimentación, mejorar la uniformidad de procesamiento y reducir los costes de producción cuando hay diferencias en la tasa de crecimiento y los requisitos nutricionales de aves macho y hembra. Aún más, para la producción comercial de huevos, la incubación y crianza de pollos machos es altamente indeseable, lo que lleva al sacrificio de miles de millones de pollitos machos cada año.

Además, hay un porcentaje de huevos que no están fertilizados o que no comprenden un embrión viable al comienzo del período de incubación, lo que reduce en gran medida la capacidad de las incubadoras en los criaderos. Hasta ahora, la determinación de los embriones viables, es decir, los embriones vivos se realizó típicamente empleando una técnica conocida como "mirar a traluz", como se describe, por ejemplo, en los documentos EP-A-2369336 y US 7950349. En este documento, se inspecciona un huevo utilizando una fuente de luz que emite luz de una longitud de onda que permite pasar al menos en parte a través del huevo.

Aunque esto puede permitir identificar si un huevo contiene un embrión vivo, sin embargo, para obtener resultados confiables, requerirá que el huevo haya progresado al menos hasta el día 11, o incluso a una etapa posterior de su desarrollo. Además, aunque esta técnica puede discriminar entre huevos vivos y no vivos, no permite determinar de manera confiable el género y otras características de las aves no eclosionadas.

Como resultado, se requiere una capacidad de incubación de las granjas de pollos actuales, que es al menos el doble de necesaria si se dispone de una selección de género temprana, lo que permite la selección de embriones de pollitos principalmente hembras.

En consecuencia, sería de gran valor para el medio ambiente, mediante la reducción de la cantidad de energía y otros recursos requeridos, pero igualmente para la eliminación del corte innecesario de pollitos machos, así como la reducción del estrés para las aves recién nacidas, si se disponía de un método de etapa temprana que permitiera determinar el género de los embriones aviares antes de la fase de incubación, también permitiría aumentar considerablemente la capacidad de los criaderos.

Un beneficio adicional sería si el método también permitiera seleccionar embriones viables en lugar de huevos no fertilizados y/o por lo demás no viables, aumentando aún más la eficiencia del proceso de incubación.

Y Feng et al. divulga en Appl. Magn. Reson (2007), 32257-268, el análisis de los metabolitos en el líquido alantoico de los huevos de gallina el día 9 mediante espectroscopía de NMR a una intensidad de campo súper alta de 900 MHz. El documento US6365339 divulga un método para la determinación de género de un embrión aviar que comprende: obtener una muestra de fluido alantoico del embrión; analizar la muestra para un pico de un compuesto específico del sexo en un espectro de un espectrómetro de movilidad de iones; y correlacionar el pico del espectro de muestra para diferenciar un embrión masculino de uno femenino.

Gu D.-C. et al, Chinese Journal of Animal Science, vol. 7, 23-25 divulga el análisis de las concentraciones de ácido aspártico libre, ácido glutámico, arginina y leucina en fluidos alantoicos y amnióticos durante la incubación de cría de huevos por HPLC. Sin embargo, el proceso descrito no va más allá de producir una línea de base para la comparación de huevos de una fecha de puesta no especificada, sino que simplemente establece una línea de base para cuatro aminoácidos. Además, el método de examen divulgado es destructivo, ya que no se permitieron los huevos con embriones vivos para madurar y convertirse en crías después del examen o para otros fines, como la producción de vacunas

Los documentos US-A-2003/0096319 y WO-A-2006124456 divulgan métodos para determinar el género de un embrión aviar en un huevo al determinar la presencia de un compuesto esteroide estrogénico en una muestra de líquido embrionario, como líquido alantoico o sangre del huevo aviar Si bien esto puede ser factible sin la destrucción del huevo, las cantidades de esteroides estrogénicos son mínimas. El documento WO 98/14781 describe un método

para determinar el género de un ave que comprende detectar la presencia o ausencia de un nivel elevado de hormona relacionada con el sexo. en el líquido extraembrionario del huevo de ave, y luego determinar el sexo del ave dentro del huevo por la presencia de un nivel elevado de hormona relacionada con el sexo. Preferiblemente, la hormona relacionada con el sexo es un estrógeno. El fluido extraembrionario es fluido alantoico. También se describen los métodos de clasificación. y la prueba solo tendrá éxito después del desarrollo de las gónadas, por lo tanto, en un punto comparativamente tardío en el desarrollo del embrión. Aún más, el método del documento WO-A-2006124456 también requerirá la modificación de marcadores de fluorescencia para cada especie y subgrupo de la misma, o la modificación genética de dichas especies. J.T. Lokemoen, et. al (J. Field Ornithol Vol. 67, No. 4, páginas 660-668, 1996) divulgan un método de mirar a trasluz (no destructivo para el embrión en un huevo) para determinar la etapa de incubación (= etapa de desarrollo) de los huevos de paseriformes.

Ohta Y. et al., Poultry Science, vol. 80, No. 10, 1430-1346, divulga el efecto de la administración in ovo de aminoácidos, para ver cómo afecta esto a las concentraciones de aminoácidos de los embriones y otros contenidos de huevos de los huevos reproductores de pollos de engorde. Sin embargo, este no es un método para determinar el género, la viabilidad y/o la etapa de desarrollo de un huevo aviar.

#### Resumen de la invención

De acuerdo con lo anterior, la presente invención se refiere a un proceso para la determinación no destructiva del género y/o la etapa de desarrollo de un embrión aviar en un huevo, que comprende (a) detectar al menos un primer marcador de desarrollo para la determinación de la etapa seleccionada de Betaina. Aspartato, arginina, glutamato, glutamina y prolina y/o al menos un primer marcador de desarrollo para la determinación del género seleccionado entre glucosa, colina y/o valina en el líquido alantoico de un huevo en un período de tiempo desde el inicio de la incubación del huevo hasta la eclosión;

(b) medir la cantidad de al menos primer compuesto marcador del desarrollo detectado para la determinación de la etapa de desarrollo y/o el género; y (c) comparar la cantidad con una línea de base establecida para machos y hembras, o etapa de desarrollo del embrión para determinar si el embrión es masculino o femenino y/o la etapa de desarrollo del embrión.

Preferiblemente, (c) incluye un análisis univariado o multivariado de los metabolitos medidos, y una determinación de la asociación del embrión aviar con una cierta población que comprende un programa de análisis de componentes principales y/o un programa de análisis de regresión de mínimos cuadrados parcial.

La presente divulgación se refiere además al uso de una multitud de huevos obtenidos mediante este proceso, en el que comprende determinar la etapa de desarrollo del embrión y el tiempo hasta que es probable que se produzca la eclosión, y la separación de los huevos en multitud de huevos con similares o iguales etapas de desarrollo, para la producción de alimento para animales y/o humanos, para la producción y/o aislamiento de compuestos cosméticos, médicos y/o nutricionales, para la producción de metano mediante fermentación y/o producción de fertilizantes de alta calidad.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa el modelado parcial de mínimos cuadrados, un análisis de datos multivariado no supervisado, para datos de  $^1\text{H}$  RMN para agrupar muestras en base a todos los metabolitos detectados en  $^1\text{H}$  RMN de un conjunto de laboratorio de huevos de gallina. F representa hembra, M representa macho.

La Figura 2 muestra el modelo de mínimos cuadrados parciales, un análisis de datos multivariado no supervisado, para los datos de  $^1\text{H}$  NMR para agrupar muestras basándose en todos los metabolitos detectados en  $^1\text{H}$  NMR de un conjunto de pruebas más grande de un criadero de pollos comercial. F representa hembra, M representa macho.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se describe ahora más detalladamente a continuación con referencia al dibujo adjunto, en el que se muestra una realización preferida de la invención. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Los términos "aviar" y "ave", como se usan en este documento, incluyen machos o hembras de cualquier especie aviar, pero están destinados principalmente a abarcar aves de corral que se crían comercialmente para huevos o carne. De acuerdo con, los términos "ave" y "aviar" están especialmente destinados a abarcar pollo, pavos, patos, gansos, codornices y faisanes.

El término "incubación" en este documento se refiere al proceso por el cual las aves incuban sus huevos y al desarrollo del embrión dentro del huevo después de abandonar el tracto de la gallina. El período de incubación en este documento se refiere al tiempo ininterrumpido durante el cual un huevo en particular se somete a condiciones que imitan la

incubación hasta la eclosión, es decir, la emergencia de las aves, incluida cualquier manipulación o transferencia de, por ejemplo, una incubadora a una unidad de incubación, siempre que se no se estanque el desarrollo de un ave.

5 El término "in ovo", como se usa en el presente documento, se refiere a los embriones de aves contenidos dentro de un huevo antes de la eclosión. La presente invención puede ponerse en práctica con cualquier tipo de huevo de ave, que incluye, entre otros, huevos de gallina, pavo, pato, ganso, codorniz y faisán (domesticados).

10 Los términos "inyección" e "inyección" en el presente documento abarcan métodos para insertar un dispositivo (típicamente un dispositivo alargado) en un huevo o embrión, incluidos los métodos para administrar o descargar una sustancia en un huevo o embrión, métodos para eliminar una sustancia (es decir, una muestra) de un óvulo o embrión, y/o métodos para insertar un dispositivo detector en un huevo o embrión.

15 La determinación de acuerdo con la presente invención se realiza como un método no destructivo, es decir, permitiendo que crezcan los embriones aviares así probados, si así se desea, o sometidos a etapas adicionales como la producción de vacunas in ovo, siempre que el embrión sea viable.

20 El término "fluido alantoico" en el presente documento abarca el fluido alantoico con o sin la presencia de otros materiales de huevo. Por ejemplo, el término fluido alantoico puede incluir una mezcla de sangre y fluido alantoico. Las realizaciones de la presente invención no se limitan a extraer material del fluido alantoico o de áreas cercanas a la superficie superior de un huevo. La eliminación del material del fluido alantoico como se describe en este documento se proporciona como un simple ejemplo de posibles realizaciones de la presente invención.

25 Se pueden extraer de un huevo diversos materiales que incluyen, entre otros, membrana amniótica, yema, cáscara, albúmina, tejido, y/o sangre, y se analizan para identificar uno o más marcadores de desarrollo, como se describe a continuación. El material puede ser extraído de huevos que tengan virtualmente cualquier orientación. El término "ubicación predeterminada" en este documento indica una posición fija o profundidad dentro de un huevo. Por ejemplo, un dispositivo puede inyectarse en un huevo a una profundidad fija y/o posición fija en el huevo. En realizaciones alternativas, la inyección puede llevarse a cabo basándose en la información obtenida del huevo, por ejemplo, con respecto a la posición del embrión o la cavidad subgerminal dentro del huevo. El término "comparar la cantidad" puede incluir ventajosamente un análisis univariado o preferiblemente multivariado de los metabolitos medidos, y una determinación de la asociación de un embrión aviar con una cierta población. La etapa puede comprender determinar la presencia de los analitos, es decir, los metabolitos, en el material de la muestra mediante análisis estadístico multivariado del espectro de masas, NMR, o datos adecuados medidos de otra manera. El programa de análisis estadístico multivariado comprende preferiblemente un programa de análisis de componentes principales y/o un programa de análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales. Por lo tanto, la divulgación también se refiere a un proceso, aparato y sistema para la determinación del género y/o etapa de desarrollo de un embrión aviar in ovo, que comprende un programa de análisis estadístico multivariado, así como un proceso implementado por microprocesador para la determinación del mismo. Los procesos y aparatos de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación se pueden utilizar para identificar una o más características de un huevo en cualquier momento durante el período de desarrollo embrionario, también denominado período de incubación del mismo. Las realizaciones de la presente invención no se limitan a un día particular durante el período de desarrollo embrionario.

45 En el presente proceso, los marcadores de desarrollo pueden analizarse preferiblemente de forma invasiva o no invasiva.

50 Si el análisis se realiza de forma invasiva, esto normalmente incluye la extracción de una muestra de material de huevo. La muestra se toma preferiblemente del fluido alantoico, ya que es probable que esto dañe al embrión. El fluido alantoico es típicamente un medio excretor para los metabolitos nitrogenados de un embrión aviar. El fluido alantoico comienza a formarse alrededor del día 3 de incubación, según lo revelado por Hamburger, V y Hamilton, HL (1951). "A series of normal stages in the development of the chick embryo". Journal of Morphology 88 (1) 49-92.

55 En este documento se indica que la alantoides fue distinguible 65 horas después de la incubación, como una bolsa corta de pared gruesa, que aún no es vesicular. Después de 72 horas, la alantoides era vesicular, de tamaño variable en el promedio del tamaño del cerebro medio, lo que indica que la alantoides y el fluido alantoico están presentes a partir del día 3.

60 Alcanza un volumen máximo aproximadamente el día 13 de incubación y luego disminuye de volumen a medida que la incubación continúa debido a la pérdida de humedad y la resorción del fluido, pero aún está presente en volúmenes significativos el día 18 de incubación.

65 El fluido alantoico está separado de la cáscara del huevo por las membranas de la capa interna y externa y las membranas corioalantoicas. Aunque el fluido alantoico abarca toda la periferia de un huevo embrionado, el fluido alantoico generalmente se acumula en la parte superior de un huevo directamente debajo de las membranas que recubren la célula de aire.

- 5 La acumulación del fluido alantoico en la parte superior del huevo se debe a la gravedad y al desplazamiento del embrión denso y del saco vitelino. Intentar tomar muestras con precisión del fluido alantoico a través de la parte superior de un huevo mientras el huevo está en posición vertical puede ser difícil debido a la variabilidad del espacio de aire de un huevo a otro. La gravedad se puede utilizar para agrupar el fluido alantoico en un sitio localizado. Cuando un huevo se gira sobre su eje longitudinal, el fluido alantoico se acumulará en la parte superior del huevo, directamente debajo de la cáscara. La colocación del huevo en su eje longitudinal hace que el fluido alantoico sea útil para la extracción de una muestra
- 10 La extracción de material, como el fluido alantoico de los huevos, se puede realizar de varias maneras, incluida la penetración de la cáscara del huevo y la inserción de una cánula de muestreo a través de las membranas. Luego se puede recuperar una muestra del fluido a muestrear, mientras que la membrana y/o la cáscara se sellan activamente con un sellador adecuado o se deja sellar.
- 15 Los métodos y aparatos adecuados para la penetración de huevos y el muestreo invasivo de material de huevo se divulgan, por ejemplo, en los documentos US-A-20070137577 WO-A-00/22921 o WO-A-99/34667 sometido a un protocolo adecuado para permitir la detección de los marcadores de desarrollo, y un análisis de las cantidades relativas y/o absolutas de marcadores de desarrollo presentes.
- 20 La muestra puede analizarse mediante cualquier método adecuado para detectar y cuantificar el marcador o marcadores de desarrollo. Preferiblemente, el análisis se realiza mediante un método de imagen de resonancia magnética que incluye métodos de resonancia nuclear: métodos de resonancia espectral que incluyen espectroscopia infrarroja o Raman, y/o métodos analíticos como GC o HPLC junto con detectores adecuados, espectroscopia de fluorescencia y/o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, incluidos los métodos húmedos y secos, como el uso de un método de varilla de nivel. Si bien los métodos invasivos permiten tomar una muestra directamente y someter el fluido muestreado a un análisis, preferiblemente el análisis se realiza de manera no invasiva debido a la eficiencia de dicho método de análisis y al hecho de que la cáscara y las membranas de los huevos permanecen imperforadas.
- 25 Se puede emplear cualquier método adecuado para realizar dicho análisis no invasivo. Típicamente, se pueden emplear métodos de resonancia espectral cuantitativa que incluyen espectroscopia infrarroja o Raman, preferiblemente usando espectros secundarios para la determinación de la presencia y cantidades absolutas y/o relativas de marcadores de desarrollo presentes en un huevo, mientras que varias publicaciones han divulgado el uso de métodos no invasivos, por ejemplo, los documentos US-A-2011/144473 y US-A-7950349, estas publicaciones solo describen vagamente los espectros de emisión globales, que en la práctica no permiten seleccionar la etapa de desarrollo, la viabilidad y/o el género de un embrión. El presente proceso difiere en particular de los métodos divulgados en que se determina la presencia de componentes específicos en el huevo, lo que se puede hacer ventajosamente utilizando espectros derivados secundarios que permiten buscar selectivamente las cantidades absolutas y relativas de uno o más compuestos marcadores del desarrollo.
- 30 En particular, la espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier derivada (FTIR) y FT-Raman, o una combinación de las mismas, puede emplearse ventajosamente para lograr la precisión y repetibilidad necesarias, mientras que los métodos de resonancia magnética nuclear pueden emplearse adecuadamente para determinar la naturaleza de los marcadores de desarrollo, y establecer una línea de base para calibrar el sistema.
- 35 El presente proceso permite ventajosamente determinar el género de un embrión, y/o preferiblemente las etapas de desarrollo desde el comienzo de la incubación del huevo hasta la eclosión.
- 40 Preferiblemente, la determinación se realiza en un período de 1 a 15 días, más preferiblemente de 2 a 14, aún más preferiblemente de 3 a 13, e incluso más preferiblemente de 4 a 12 días después de que se inicie la incubación tal como realizar la etapa a) preferiblemente en un período de tiempo de 6 a 12 días después del comienzo de la incubación del huevo.
- 45 Esto permite evitar los costes involucrados en la incubación de huevos que no son viables y/o no son del género deseado. Además, se puede determinar la etapa de desarrollo real de un huevo. Para especies con tiempos de incubación más cortos o más largos que los de los pollos domesticados, se pueden aplicar otros períodos, según corresponda.
- 50 En el presente documento se divulgan marcadores de desarrollo seleccionados de azúcares, aminoácidos y sus respectivos metabolitos y/o precursores.
- 55 De estos marcadores de desarrollo de particular importancia en el contexto de la presente invención son la glucosa, la colina y la valina, cada una de las cuales tuvo una influencia estadísticamente significativa en la determinación del género del embrión aviar.
- 60 Sin desear estar ligados a ninguna teoría particular, se considera que la Colina y la trimetilglicina, su derivado de aminoácido, se usan particularmente para apoyar el desarrollo del sistema nervioso del feto. Se encontró que la proporción de colina y trimetilglicina (betaína) difiere fuertemente entre los embriones macho y hembra, mientras que
- 65

- también las cantidades absolutas de colina eran mayores en el líquido alantoico de los embriones femeninos. En general, la colina y sus metabolitos son necesarios para tres propósitos fisiológicos principales: funciones de integridad estructural roles y señalización de las membranas celulares, la neurotransmisión colinérgica (síntesis de acetilcolina) y una fuente importante de grupos metilo a través de su metabolito, la trimetilglicina (betaína), que participa en las vías de síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), Valina y Glucosa, por otro lado, también se encontró que varían significativamente entre embriones macho y hembra
- 5
- Cuando la especie aviar es *Gallus gallus domesticus*, un primer marcador de desarrollo o más es la glucosa en una cantidad absoluta para un embrión femenino en el rango de 30  $\mu\text{M/ml}$  a 70  $\mu\text{M/ml}$ , y para un embrión macho de 1  $\mu\text{M/ml}$  a 30  $\mu\text{M/ml}$  en el fluido alantoico.
- 10
- Otro marcador de desarrollo primero o adicional para los embriones de *Gallus gallus domesticus* es la colina, en una cantidad absoluta para un embrión femenino en el rango de 110  $\mu\text{M/ml}$  a 130  $\mu\text{M/ml}$ , y para un embrión masculino de 90  $\mu\text{M/ml}$  hasta, pero sin incluir 110  $\mu\text{M/ml}$ , en el fluido alantoico.
- 15
- Sin embargo, otro marcador de desarrollo primero o adicional para los embriones de *Gallus gallus domesticus* es Valina, en una cantidad absoluta para un embrión femenino en el rango de 110  $\mu\text{M/ml}$  a 130  $\mu\text{M/ml}$ , y para un embrión macho de 90  $\mu\text{M/ml}$  hasta, pero sin incluir, 110  $\mu\text{M/ml}$ , en el fluido alantoico.
- 20
- Preferiblemente, en el proceso en cuestión, se detecta al menos un segundo marcador en la etapa (a), y en el que los marcadores al menos primero y segundo se analizan y se comparan con la línea de base, y entre sí para establecer una relación de marcador de desarrollo.
- 25
- Al correlacionar el análisis de dos o tres marcadores, la selectividad de la determinación de género puede mejorarse ventajosamente. De acuerdo con lo anterior, preferiblemente se detectan y analizan al menos un primer y un segundo y/o un marcador de desarrollo adicional, en donde las cantidades absolutas y la proporción de al menos el primero al segundo y/o marcadores adicionales se emplean para determinar el género
- 30
- El presente proceso comprende además ventajosamente determinar si un embrión en un huevo es macho o hembra, y separar una multitud de huevos macho de una multitud de huevos hembra para formar una selección de huevos predominantemente masculina o predominantemente femenina.
- 35
- Las selecciones de huevos hembra o macho así formadas pueden someterse ventajosamente a un proceso de incubación y eclosión para formar una población de pollos predominantemente femenina o masculina.
- 40
- El presente proceso comprende además preferiblemente inyectar un virus o material similar a virus en cada huevo identificado como que contiene un embrión vivo y macho o hembra y, preferiblemente, después de la incubación comprende aislar la vacuna obtenida de los huevos incubados.
- 45
- Después de la inyección con un virus de semilla, los huevos que contienen embriones vivos se transfieren preferiblemente a una incubadora durante un período de tiempo predeterminado. Al final de este período de tiempo, los huevos se transfieren a una estación de recolección de vacunas donde se extrae el material de cada huevo, por ejemplo, el líquido amniótico.
- 50
- De acuerdo con lo anterior, el presente proceso también comprende preferiblemente las etapas de la eutanasia de un embrión en el huevo infectado, y la recolección de líquido amniótico de cada huevo sacrificado, en el que el líquido amniótico comprende una vacuna; y preferiblemente aislar una vacuna del líquido amniótico. Preferiblemente, el virus comprende el virus de la gripe humana y, por lo tanto, el líquido amniótico recogido comprende la vacuna de la gripe humana.
- 55
- Los marcadores de desarrollo utilizados en la presente invención también pueden emplearse para determinar la edad de un embrión.
- 60
- Los marcadores de desarrollo divulgados en el presente documento útiles para la determinación de la edad del embrión se seleccionan preferiblemente de aminoácidos, y sus respectivos metabolitos y/o precursores. Los solicitantes encontraron que, en particular, las cantidades absolutas y relativas de aminoácidos, más preferiblemente trimetilglicina, también conocida como Betaína, Aspartato y Asparagina, Glutamato y Glutamina y Pralina podrían estar directamente relacionados con la etapa de desarrollo de un embrión aviar in ovo. Esto es muy relevante, ya que hay pocas características que permiten determinar la etapa de desarrollo, o la edad, de un embrión aviar, en particular en las primeras etapas del desarrollo.
- 65
- De acuerdo con lo anterior, el presente proceso también permite, preferiblemente, seleccionar huevos de esencialmente la misma etapa de desarrollo, o edad real, y combinar una multitud de huevos de esencialmente la misma edad, para someter a los huevos a una incubación controlada. El período de incubación resultante debe ser más uniforme, resultando en una población de pollos más uniforme, de mayor calidad debido al estrés acumulado, y

reduciendo el número de aves incubadas tempranas que están expuestas a una exposición prolongada a las condiciones de incubación artificial

5 La población de aves incubadas resultante mostrará una calidad más alta, lo que resultará en un mayor rendimiento y menores requisitos de seguimiento para la población de pollos, por ejemplo, a través de cantidades reducidas de tratamientos.

10 De manera similar, el uso de poblaciones de huevos seleccionadas por edad también permitirá preparar vacunas de manera más eficiente, ya que aquí la etapa de desarrollo de un embrión aviar es relevante para el momento en el que se inyecta un virus de la manera más eficiente, y una vacuna recolectada.

La presente divulgación también se refiere a selecciones de huevos y después de incubar a un pollito o a una población de pollos obtenible mediante el proceso.

15 Los siguientes ejemplos no limitativos se proporcionan para ilustrar la invención.

#### Ejemplo 1 Protocolo de perfil metabólico in ovo

20 Los huevos de *Gallus gallus domesticus* se incubaron a 37.8°C, girando cada hora, en una incubadora modelo 50, obtenible comercialmente de MS Broedmachines V.O.F.

Se incubó un grupo de 12 huevos durante 9 días, un segundo grupo de 12 huevos durante 10 días y un tercer grupo de 12 huevos durante 11 días.

25 Se sacaron los huevos de la incubadora, se colocaron en un soporte de papel, bajo un microscopio, con el saco de aire hacia arriba. La cáscara y las membranas se perforaron y se rompieron abiertas alrededor del saco de aire, dejando las membranas internas intactas.

30 Usando la luz, se localizaron los vasos sanguíneos que se extendían sobre la membrana de la capa interna, y se realizó una pequeña punción que evitaba los vasos sanguíneos a través de las membranas interna y externa en la cavidad alantoica.

35 Se sesgó el huevo y luego se usó una pipeta de 1 ml para soplar aire en la cavidad, después de lo cual se extrajeron 1,5 a 2 ml de fluido alantoico usando la pipeta. Esto se transfirió a un criovial, que se sumergió inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras se sacaron y se almacenaron a -80°C.

Se sacó el embrión del huevo, cortando las membranas y usando una cuchara pequeña. Se colocó en un tubo falcon lleno con etanol al 96% y en hielo y se almacenó en un lugar oscuro a temperatura ambiente.

40 El fluido alantoico se extrajo de -80°C descongelado y se extrajo una muestra de 1 ml y se colocó en un vial de vidrio. 1 ml de cloroformo y 1 ml de una mezcla de metanol y agua (1:1). se agregaron a la muestra utilizando pipetas de Pasteur de vidrio. Los viales se cerraron con una tapa y luego se agitaron durante 20 segundos y luego se colocaron a 4°C durante 10 minutos. Usando una pipeta Pasteur de vidrio, se extrajo 1 ml de la parte superior de la mezcla y se transfirió a un criovial. La tapa de este criovial se perforó y se liofilizó durante la noche. Este producto liofilizado se empleó como muestra de NMR.

#### Ejemplo 2

50 Protocolo de perfil metabólico in ovo

Los huevos de *Gallus gallus domesticus* se incubaron a 37.8°C en un criadero comercial que giraba cada hora, en una incubadora industrial comercialmente disponible de Petersime NV. Se incubó un grupo de 50 huevos durante 8 días, un segundo grupo de 50 huevos durante 9 días y un tercer grupo de 50 huevos durante 10 días.

55 Se sacaron los huevos de la incubadora, se colocaron en un soporte de plástico bajo un microscopio, con el saco de aire hacia arriba.

60 La cáscara y las membranas se perforaron y rompieron alrededor del saco de aire, dejando las membranas internas intactas. Usando la luz, se localizaron los vasos sanguíneos que se extendían sobre la membrana de la capa interna, y se realizó una pequeña punción que evitaba los vasos sanguíneos a través de las membranas interna y externa hacia la cavidad alantoica.

65 Se sesgó el huevo y luego se usó una pipeta de 1 ml para soplar aire en la cavidad, después de lo cual se extrajeron 1.5 a 2 ml de fluido alantoico usando la pipeta. Esto se transfirió a un criovial, que se sumergió inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras se sacaron y se almacenaron a -80°C.

El embrión fue sacado del huevo, cortando las membranas y usando una cuchara pequeña. Se colocó en un tubo falcon lleno con etanol al 96% y en hielo y se almacenó en un lugar oscuro a temperatura ambiente.

5 El fluido alantoico se extrajo de -80°C, se descongeló y se puso una muestra de 0.5 ml en criovial. La tapa de este criovial se perforó y se liofilizó durante la noche. Este producto liofilizado se empleó como muestra de RMN.

Determinación de género - Verificación:

10 El embrión de pollo se sacó del etanol y se dejó secar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se cortó una pequeña parte de la pierna izquierda y se usó para extraer ADN, usando un kit de extracción de ADN (que se puede obtener comercialmente como kit Qiagen DNeasy), después de lo cual se midió la cantidad con un dispositivo NanoDrop.

15 Se usó la PCR utilizando el par de cebadores 1272H y 1237L, que se puede obtener comercialmente de Sigma, para determinar el género del embrión. El programa de PCR utilizado fue de 95°C durante 5 minutos, luego 36 veces a 95°C durante 45 segundos, 56°C durante 45 segundos, 72°C durante 1 minuto, después de lo cual se realizó una ejecución a 72°C durante 5 minutos. El género del embrión se determinó en función del producto de PCR resultante, identificado mediante el uso de un gel de agar al 2%.

20 Preparación de muestra RMN

25 Se sometieron 50-100 mg del material de muestra obtenido como se describió anteriormente a mediciones de RMN resueltas en  $H^1$  H-J (2D)  $^{-1}$  bidimensionales, utilizando ácido 3-(trimetilsilil)propiónico-2,2,3,3-d4. (TSP) como un estándar interno, como se describe en Nature Protocols, Vol. 5, No. 3, 2010, páginas 536-549, y Phytochemistry 71, 2010, 773-784.

Los datos obtenidos para el Ejemplo 1 se representan en la Tabla 1:

30 Tabla 1: Datos medidos para embriones macho y hembra

Dev. de Marcadores	Hembras ( $\mu$ M/mL; desviación estándar en paréntesis)	Machos ( $\mu$ M/mL; desviación estándar en paréntesis)
Glucosa	51 (17.7)	32.2 (10.5)
Colina	125.8 (21.4)	101.3 (21.1)
Valina	23.7 (4.09)	28.6 (3.63)

Análisis de datos multivariados

35 En un modelo de mínimos cuadrados parciales, se empleó un análisis de datos multivariado no supervisado para los datos de  $^1H$  RMN para agrupar muestras basándose en todos los metabolitos detectados en  $^1H$  RMN. La información más importante obtenida fue la correlación entre dos conjuntos de datos, es decir, las señales de  $^1H$  RMN (metabolitos) medidas y la clasificación de la muestra (información del grupo).

40 El análisis no solo reveló las cantidades absolutas de marcadores de desarrollo para embriones masculinos o femeninos, sino también las cantidades relativas. Cuando se agregaron un segundo marcador y un tercer marcador, respectivamente, la selectividad de la prueba aumentó aún más, las Figuras 1 y 2 divulgar los resultados de un análisis multivariado del Ejemplo 1 y 2, respectivamente, y superponer con la determinación de género.

45 Ejemplo 3

Determinación de la edad del embrión

50 Se repitió el Ejemplo 1, sin embargo, se analizaron los siguientes marcadores de desarrollo que se encontraron relevantes para la determinación de la etapa de desarrollo, o la edad de los embriones.

Tabla 2: Datos de medición para los días 9 a 11

Desarrollo	9 días ( $\mu$ M/mL)	10 días ( $\mu$ M/mL)	11 días ( $\mu$ M/mL)
Marcador	Desviación estándar en paréntesis ( )		
Trimetilglicina (Betaína)	0.75 (0.27)	0.65 (0.2)	0.42(0.13)

## ES 2 709 027 T3

Aspartato y Asparagina	9.35 (3.2)	7.72 (2.75)	5.34 (3.91)
Glutamato y Glutamina	41.5 (7.71)	37.1 (3.94)	31.7 (5.33)
Prolina	12.7 (2.69)	11 (1.58)	9.02 (1.59)

Los datos anteriores indican claramente que la etapa de desarrollo de un embrión se puede determinar a partir de uno o más marcadores de desarrollo.

- 5 Se empleó un modelo de mínimos cuadrados parciales, un análisis de datos multivariado no supervisado, para los datos de <sup>1</sup>H RMN para agrupar muestras basándose en todos los metabolitos detectados en <sup>1</sup>H RMN. La información más importante obtenida fue la correlación entre dos conjuntos de datos, es decir, las señales de <sup>1</sup>H RMN (metabolitos) medidas y la clasificación de la muestra (información del grupo).
- 10 El modelo multivariado demostró la asociación entre el género y/o la edad de un embrión y las cantidades relativas de metabolitos presentes. El uso de métodos analíticos alternativos, como por ejemplo GCMS, dio resultados similares, corroborando así los resultados.
- 15 El análisis no solo reveló las cantidades absolutas de marcadores de desarrollo para la etapa de desarrollo, sino también las cantidades relativas. Cuando se agregaron un segundo, tercer y cuarto marcador, respectivamente, la selectividad de la prueba aumentó aún más.

Los ejemplos anteriores muestran claramente las ventajas del proceso y los materiales de la presente invención.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un proceso para la determinación no destructiva del género y/o etapa de desarrollo de un embrión aviar en un huevo, que comprende
- 10 (a) detectar al menos un primer marcador de desarrollo para la determinación de la etapa de desarrollo seleccionada de Betaína, Aspartato, Arginina, Glutamato, glutamina y prolina y/o al menos un primer marcador de desarrollo para la determinación del género seleccionado entre Glucosa, Colina y/o Valina en el líquido alantoico de un huevo en un período de tiempo desde el inicio de la incubación del huevo hasta la eclosión;
- 15 (b) medir la cantidad de al menos primer compuesto marcador del desarrollo detectado para la determinación de la etapa de desarrollo y/o el género; y
- (c) comparar la cantidad con una línea de base establecida para hombres y mujeres, y/o la etapa de desarrollo del embrión, para determinar si el embrión es masculino o femenino y/o la etapa de desarrollo del embrión.
- 20 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que (c) incluye un análisis univariado o multivariado de los metabolitos medidos, y una determinación de la asociación del embrión aviar con una cierta población que comprende un programa de análisis de componentes principales, y/o un programa de análisis de regresión por mínimos cuadrados.
- 25 3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que al menos un segundo marcador se detecta en la etapa (a), y en el que los al menos primeros y segundos marcadores se analizan y se comparan con la línea de base, y entre sí para establecer una relación de marcador de desarrollo.
- 30 4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la especie aviar es Gallus gallus domesticus, y en el que un primer marcador de desarrollo o más es glucosa en cantidad absoluta para un embrión hembra en el rango de 30  $\mu\text{M/ml}$  a 70  $\mu\text{M/ml}$ , y para un embrión masculino de 1  $\mu\text{M/ml}$  hasta 30  $\mu\text{M/ml}$ .
- 35 5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que un marcador de desarrollo primero o adicional es Colina en una cantidad absoluta para un embrión femenino en el intervalo de 110  $\mu\text{M/ml}$  a 130  $\mu\text{M/ml}$ , y para un embrión masculino de 90  $\mu\text{M/ml}$  hasta, pero sin incluir 110  $\mu\text{M/ml}$ .
6. Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en el que un primer marcador de desarrollo o más es Valina en una cantidad absoluta para un embrión femenino en el rango de 110  $\mu\text{M/ml}$  a 130  $\mu\text{M/ml}$ , y para un embrión masculino de 90  $\mu\text{M/ml}$  hasta, pero sin incluir 110  $\mu\text{M/ml}$ .
- 40 7. Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 3 a 6, en el que al menos un primer y un segundo marcador de desarrollo se detectan y analizan, y en el que se emplean las cantidades absolutas y la proporción de al menos el primer a segundo marcador para determinar el género.
- 45 8. Un proceso según la reivindicación 7, en el que el análisis se realiza mediante un método de formación de imágenes por resonancia magnética que incluye métodos de resonancia nuclear; por un método de resonancia espectral que incluye espectroscopia infrarroja o Raman; y/o un método analítico como GC o HPLC acoplado con detectores adecuados, espectroscopia de fluorescencia y/o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.
- 50 9. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos uno de;
- (i) determinar si un embrión en un huevo es masculino o femenino, y separar una multitud de huevos masculinos de una multitud de huevos femeninos, para formar una selección de huevos predominantemente masculina o predominantemente femenina; (ii) determinar si un embrión en un huevo es masculino o femenino, y separa una multitud de huevos masculinos de una multitud de huevos femeninos, para formar una selección de huevos predominantemente masculina o predominantemente femenina, y someter las selecciones de huevos femeninas o masculinas a un proceso de incubación y eclosión para formar una población predominantemente femenina o masculina de pollos.
- 55 10. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende (iii) determinar la etapa de desarrollo del embrión y el tiempo hasta que es probable que ocurra la eclosión, y separar los huevos en multitudes de huevos con una etapa de desarrollo similar o igual.
- 60 11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 10; que comprende además someter las selecciones de huevos a un proceso de incubación y eclosión en línea con la fecha de eclosión prevista, para formar una población de pollos de predominantemente la misma etapa de desarrollo.

12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, que además comprende (vi) inyectar un virus o material similar a virus en cada huevo identificado como que contiene un embrión vivo y un macho o una hembra, y/o de una cierta etapa de desarrollo, y (vii) aislar la vacuna obtenida de los huevos incubados.
- 5 13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la especie aviar es *Gallus gallus domesticus*, y en el que los marcadores de desarrollo se seleccionan de al menos uno de: Trimetilglicina; Aspartato y/o asparagina; Glutamato y/o Glutamina, y/o Prolina.

Fig. 1

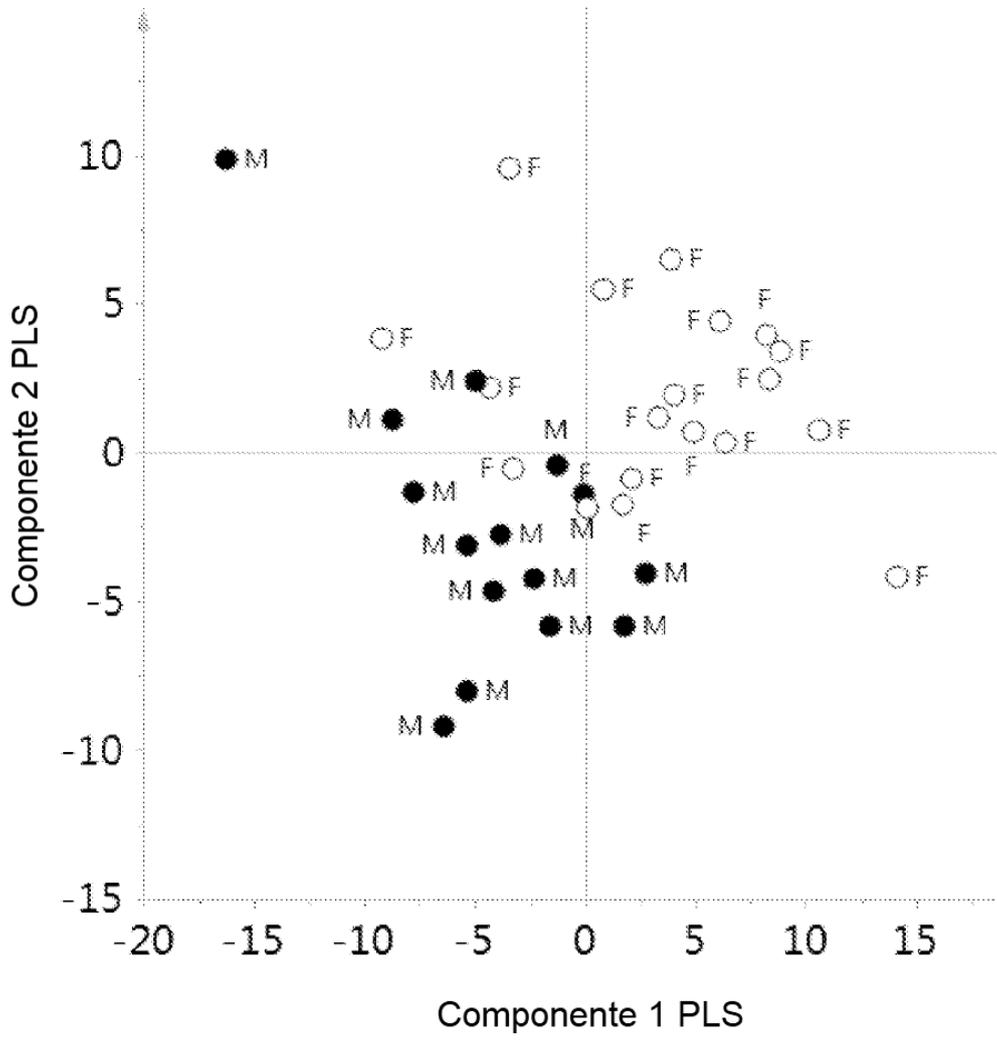


Fig.2

