



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **PI0708212-6 A2**



* B R P I 0 7 0 8 2 1 2 A 2 *

(22) Data de Depósito: 22/02/2007
(43) Data da Publicação: 17/05/2011
(RPI 2106)

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

(54) Título: **MÉTODOS APERFEIÇADOS DE PRODUÇÃO DE OVOS DE AVES E PÁSSAROS DE STATUS LIVRE DE GERMES ESPECIFICADO**

(30) Prioridade Unionista: 23/02/2006 EP PCT/EP2006/060243

(73) Titular(es): Ovagen International Limited

(72) Inventor(es): Leonard Moran

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007051737 de 22/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/096418 de 30/08/2007

(57) Resumo: CIRCUITO DE CORTE POR BAIXA TENSÃO DA BATERIA. A presente invenção refere-se a um dispositivo eletrônico que inclui um componente elétrico (16) alimentado por uma bateria (12) e um compartimento para receber a bateria. Um circuito de corte por baixa tensão (10) é configurado para acoplar-se à bateria. (12). O circuito de corte por baixa tensão (10) inclui um dispositivo de chaveamento (14) com um terminal de controle (14a), um terminal de fonte de corrente (14c) e um terminal de drenagem de corrente (14b), e um resistor (20) acoplado entre o terminal de controle (14a) e um primeiro terminal da bateria (12). O circuito tem um primeiro (IOa) e um segundo terminais de saída (IOb). O primeiro terminal de saída (1 Qa) é acoplado ao primeiro terminal da bateria e o segundo terminal de saída (IOb) é acoplado ao terminal de fonte de corrente (14c) do transistor.(14) O primeiro e o segundo terminais de saída (IOa, IOb) são configurados para aceitar conexões com os terminais positivo e negativo do componente elétrico (16).



PI0708212-6

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODOS APERFEIÇADOS DE PRODUÇÃO DE OVOS DE AVES E PÁSSAROS DE STATUS LIVRE DE GERME ESPECIFICADO**".

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se a um método aperfeiçoado de criar um pássaro de status livre de germe especificado. Especificamente, a presente invenção está direcionada a um método para aumentar a capacidade de incubação e a viabilidade de ovos removidos de maneira estéril do abdômen de uma mãe pássaro e o ovo seja status livre de germe. A invenção também se refere à produção de ovos de ave de status livre de germe especificado.

Nesse relatório, os termos "livre de contaminação" e "livre de germe" são usados intercambiavelmente. Esses termos são amplamente usados e se referem a patógenos e de infecções que podem ser portados por pássaros, particularmente aves domésticas, como frangos, perus, e outras espécies de aves, que são amplamente usadas para produzir bandos de aves para reprodução para produzir ovos férteis para produção comercial e para produzir ovos e carne para consumo humano. Além disso, tais ovos e pássaros são usados na fabricação de uma grande variedade de substâncias biológicas incluindo vacinas, anticorpos, anticorpos monoclonais, fibroblastos e proteínas, ambos para uso terapêutico e profilático em pessoas e animais. Os mesmos são também usados extensivamente para testes diagnósticos e para produção de ovos e de pássaros transgênicos. Muitos desses usos requerem que ovos e/ou os pássaros produzidos a partir dos mesmos sejam livres de todos os contaminantes especificados como, por exemplo, infecções, incluindo uma variedade de espécies de parasito, bactéria, micoplasma, vírus, retrovírus, príons, fragmentos de DNA e RNA. Algumas vezes, os vírus podem ser pequenos vírus incluindo o picornavírus e o parvovírus. Algumas das bactérias provenientes de ovos são freqüentemente contaminados incluem Clostridia e Enterobacteria. Há muitos organismos não patogênicos que deveriam ser controladas. Similarmente, são indesejáveis muitos dos microorganismos que incluem parasitos, bactéria aeróbica e

anaeróbica, espécies comensais e espécies associadas ao intestino e cloaca. Similarmente, também são indesejáveis micoplasma, os vírus incluindo retrovírus, príons, fungos, levedura e mofo.

Portanto, o termo "livre de contaminação especificada" ou "de status livre de germe" poderiam incluir algum ou todos e é muito mais amplo do que apenas patógenos específicos. Por exemplo, os patógenos livres específicos convencionais (SPF) não são especificados livres de alguns vírus e na verdade podem ser contaminados com bactéria e vírus. Portanto, para determinados usos, esses podem ser suficientes. O uso para o qual os ovos e os pássaros são destinados irá determinar os contaminantes que o ovo ou o pássaro deve estar livre. Os ovos convencionais livres de germe e alguns ovos SPF são obtidos por tratamento de ovos postos naturalmente frescos com produtos químicos, incluindo desinfetantes e antibióticos, e colocando os mesmos em isoladores. Tais ovos postos naturalmente são tomados de pássaros reprodutores mãe selecionados. Ao mesmo tempo em que esses métodos foram relativamente bem sucedidos na produção de ovos SPF, os mesmos não foram verdadeiramente bem sucedidos na produção de ovos livres de contaminantes. Contudo, os produtos químicos não são capazes de eliminar os contaminantes de, por exemplo, bactérias que entram nos poros da casca do ovo imediatamente antes da e/ou após a postura e antes de desinfecção. A contaminação dos ovos sejam SPF, livre de germe ou gnotobióticos, resulta na perda de aquiescência com especificações e, em muitos exemplos, perda de valor e utilidade comercial.

Antecedentes da Invenção

A Patente Européia No. 0 295 964 descreve uma técnica de cultura de embrião de ave *in vitro* que descreve em alguns detalhes o desenvolvimento embrionário de ovos. Esse relatório está direcionado à incubação de um embrião em um recipiente fechado após o embrião ter sido removido de sua casca. Na verdade, nesse relatório, o recipiente usado é preferivelmente parte de uma casca de ovo que tenha sido escolhida da mesma espécie como está sendo cultivada ou, em termos da presente invenção, de uma galinha similar. Esta invenção está direcionada à engenharia genética

ou aves domésticas, mas também à investigação de mecanismos fundamentais de desenvolvimento de aves. Similarmente, A Patente Europeia No. 0 511 431 descreve um método de cultura *in vitro* para um ovo fertilizado de uma galinha na qual um embrião que acaba de ser fertilizado é retirado de
5 uma parte superior do magno do oviduto de uma galinha dentro de uma hora aproximadamente após a oviposição e então subseqüentemente cultivado. Contudo, ambos os relatórios descrevem meramente a cultura artificial de ovos e não lidam com o propósito da presente invenção.

O Pedido de Patente Europeu No. 01650109 é direcionado a um
10 método de criação de um pássaro status livre de contaminação especificada. O método geral descrito nessa aplicação compreende alojar um pássaro como um pássaro mãe, remoção estéril de um ovo do pássaro mãe para transferir o ovo para a cloaca no pássaro mãe, chocar o ovo e incubar o ovo para produzir um pássaro de postura. O pedido também se refere à produ-
15 ção de ovos de pássaro de status livre de contaminação especificada.

Contudo, é sempre necessário o aperfeiçoamento de tais métodos. É desejável aumentar as taxas de capacidade de incubação e diminuir a mortalidade dos frangos vivos. É comercialmente muito desejável a obten-
20 ção tanto de resultados consistentes quando de resultados que incluam alta capacidade de incubação (idealmente, as variações de aproximação comercial de >85%, mas certamente consistentemente >50%). Isso é de particular e vital importância ao se trabalhar com populações pequenas, raras e altamente valiosas, como, por exemplo, pássaros transgênicos.

A presente invenção, ao contrário da aplicação anterior, propor-
25 ciona métodos aperfeiçoados para se obter consistentemente alta capacidade de incubação de ovos livres de germe. Portanto, a presente invenção está direcionada a um refinamento e aperfeiçoamento do processo, conforme reivindicado no Pedido de Patente Europeu No. 01650109.

Descrição da Invenção

30 A presente invenção está direcionada a um método aperfeiçoado de criação de um pássaro de status livre de germe especificado. Especificamente, a invenção se refere à aplicação de técnicas específicas que podem

ser usadas para assegurar que o ovo prematuro seja removido de sua casca antes de entrar na cloaca e permanecer estéril de acordo com a invenção.

De acordo com uma modalidade mais generalizada da presente invenção, é proporcionado um método para determinar quando deverá ocorrer a remoção do ovo prematuro de sua casca do pássaro mãe.

De acordo com um primeiro aspecto da invenção, é proporcionado um método para aumentar a capacidade de incubação e a viabilidade de ovos obtidos cirurgicamente de status livre de germe quando obtidos de um pássaro mãe onde o método é realizado em um ambiente estéril antes da remoção de um ovo prematuro de um pássaro mãe e que inclui as seguintes etapas:

- a) alojar um pássaro como um pássaro mãe;
- b) determinar a cronometragem de quando remover o ovo prematuro do pássaro mãe por:
 - i. Determinar a posição do ovo prematuro no trato reprodutivo do pássaro mãe antes da transferência do ovo prematuro para a cloaca do pássaro mãe; e
 - ii. Estabelecer quando o nível de requisito da formação da casca do ovo e a calcificação ocorreu pela determinação do estágio de desenvolvimento do ovo prematuro em termos de formação de casca e de calcificação.

De acordo com um segundo aspecto da invenção, é proporcionado um método de criação de um pássaro de status livre de germe compreendendo, em um ambiente estéril

- a) alojar um pássaro como um pássaro mãe;
- b) determinar a cronometragem de quando remover o ovo prematuro de sua casca do pássaro mãe por:
 - i. determinar a posição do ovo prematuro no trato reprodutivo do pássaro mãe antes de transferir o ovo prematuro para a cloaca do pássaro mãe; e
 - ii. estabelecer quando o nível de requisito de formação de casca de ovo e calcificação ocorreu pela determinação do estágio de desenvolvi-

mento do ovo prematuro em termos de formação de casca e de calcificação.

5 c) remover o ovo prematuro em sua casca do pássaro mãe quando o nível de requisito de formação e de calcificação de casca de ovo tiver ocorrido e antes de transferir o ovo prematuro para a cloaca no pássaro mãe; e

d) incubar o ovo prematuro em sua casca e incubar o ovo prematuro para produzir um pássaro de postura.

10 De acordo com um terceiro aspecto da invenção, é proporcionado um método para a remoção de microorganismos que possam infectar o ovo prematuro enquanto o mesmo estiver do trato reprodutivo, incluindo o ovário, antes que o ovo entre na cloaca.

De acordo com um quarto aspecto da invenção, os ovos produzidos de acordo com esta invenção são usados na produção de substâncias biológicas para fins terapêuticos e profiláticos.

15 De acordo com um quinto aspecto da invenção, o método da invenção é usado para proporcionar pássaros estérios para reabastecimento de reproduções de pássaro.

Descrição Detalhada da Invenção

20 A cloaca é a principal área de contaminação em um pássaro. A cloaca é uma câmara ligada tanto ao sistema digestivo quanto ao reprodutivo de um pássaro, portanto, podem estar presentes na cloaca ao mesmo tempo um ovo e fezes. Em geral, como uma casca de ovo é porosa por um curto período de tempo, a contaminação externa quando entra na cloaca é um grande problema. Portanto, a invenção reconheceu que são requeridos
25 métodos específicos para remover o ovo prematuro do pássaro mãe ao mesmo tempo em que matem o mesmo estéril e com status livre e germe.

Especificamente, a presente invenção reconheceu a necessidade de aperfeiçoar e refinar o método para determinar quando deve ocorrer a remoção do ovo prematuro de sua casca do pássaro mãe. Portanto, a presente invenção proporciona um método para aumentar a capacidade de incubação e a viabilidade de ovos obtidos de status livre de germe quando
30 obtidos de um pássaro mãe. Qualquer aumento na capacidade de incubação

e /ou viabilidade do ovo de status livre de germe será de significativa importância comercial, mesmo que o aumento percentual seja modesto.

A presente invenção também reconheceu que a remoção de microorganismos, bactérias, micoplasma, vírus, retrovírus, príons, parasitos, que são capazes de infectar o ovo enquanto no trato reprodutivo e antes do ovo entrar na cloaca é importante na geração de um ovo livre de germe.

Especificamente, a invenção reconhece a necessidade de determinar precisamente a posição e o estágio de desenvolvimento do ovo prematuro no trato reprodutivo antes de completar o seu desenvolvimento no pássaro mãe e antes de ser removido do pássaro mãe. Isso assegura que o ovo prematuro seja removido do pássaro mãe no tempo correto para assegurar um ovo viável e que sejam produzidos pássaros de postura. Se o ovo prematuro for removido cedo demais, poderia ser dotado de uma casca mole e descalcificada que iria requerer condições de cultura mais especializadas e poderia não resultar em um ovo viável. A remoção do ovo prematuro do trato reprodutivo antes de entrar na cloaca impede a contaminação do ovo e do pássaro produzido do mesmo. Esta invenção proporciona métodos para estabelecer quando remover o ovo do pássaro mãe e assegura que o ovo prematuro seja removido do pássaro mãe no tempo correto em termos de formação de casca e calcificação para resultar em um ovo e em um pássaro de postura viáveis.

Geralmente, antes de remover o ovo, o padrão de postura do pássaro mãe é registrado várias vezes para produzir um tempo de transferência estimado do ovo para o trato reprodutivo distal e cloaca. Nesse estágio, o ovo e sua casca estão preferivelmente totalmente formados. Isso proporciona um guia de maneira que a remoção estéril do ovo do abdômen possa ser realizada o mais próximo possível, mas antes do tempo de transferência estimado.

Idealmente, a casca do ovo deve estar calcificada para um estágio avançado que pode ser quantificado usando métodos diagnósticos como, por exemplo, radiografias ou mesmo pressão digital suave, palpação, e observação da distorção da casca. As cascas parcialmente calcificadas e em

casca específicas que são dotadas de níveis de calcificação baixos usualmente serão macias e frágeis e, portanto, dotadas de baixos níveis de capacidade de incubação. A presente invenção reconhece que os ovos prematuros não devem ser removidos nesse estágio se forem desejadas uma capacidade de incubação ótima e a viabilidade do ovo e de pássaros resultantes.

De acordo com uma modalidade da invenção, o método para definir o estágio de desenvolvimento, particularmente com relação à posição da casca e a posição no trato reprodutivo antes da remoção do ovo do pássaro mãe pode compreender observação, seja observação contínua ou gravação de vídeo do lapso de tempo da frequência normal (por exemplo, diária) e o tempo de postura do ciclo de postura normal ou modificado, conforme aplicável para espécies e pássaro individual. A observação de quando e do tempo que cada ovo reside em seções diferentes do trato reprodutivo incluindo o útero com relação ou tempo de ovulação e de postura de ovo. A correlação desses conjuntos diferentes de as observações permitem prognosticar não apenas, por exemplo, quando o próximo ovo irá permanecer no útero, como também o seu estágio de desenvolvimento, por exemplo, o grau de formação e de calcificação da casca.

O método pode em determinadas espécies maiores (por exemplo, galinhas) ser refinado pela localização física do ovo no abdômen. Essa abordagem é particularmente útil para uso de rotina após estabelecer a correlação necessária entre observações palpadas, estágio de desenvolvimento do ovo e posição no trato reprodutivo.

A confirmação da posição do ovo no trato reprodutivo, e a presença de uma casca por métodos físicos incluindo palpação abdominal e pélvica, as técnicas de visualização, como, por exemplo, ultra-som, raios-X ou MRI, e/ou observação direta por anestesia geral e cirurgia ou exame pós-morte podem também ser usados na combinação com as técnicas de observação ou em suas próprias.

As técnicas de observação normalmente requerem anestesia geral de um pássaro usando, por exemplo, halotano e oxigênio. O equipamento veterinário usado para visualização de gatos e de cachorros é fre-

qüentemente adequada para pássaros após ajustes sistemáticos para exposição de fixações. O ultra-som é apenas possível em pássaros com poucas ou nenhuma pena abdominal.

5 A palpação deveria usualmente ser realizada com o pássaro preso aproximadamente na posição de pé normal. A palpação do abdômen é feita entre o polegar e os dedos do operador. Deve ser realizada gentilmente para evitar qualquer dano ao pássaro ou aos ovos dentro do abdômen.

10 Os ovos não devem ser removidos do pássaro antes da calcificação da casca se o chocamento amplamente convencional e as condições de incubação deverem ser usadas subsequente. Os ovos mais prematuros, como, por exemplo, aqueles macios, cascas não calcificadas ou prematuros requerem condições de cultura especializadas e/ou recipientes de cascas de ovo. Em caso de dúvida para um pássaro ou ovo específico, a remoção do ovo deve ser retardada até que o ovo observado tenha sido posto.
15 Um ovo subsequente pode então ser removido.

Essas técnicas envolvem uma avaliação subjetiva por uma pessoa conduzindo o procedimento. A palpação determina se o ovo está ou não macio e não calcificado. Essa técnica pode ser combinada com técnicas para determinar a posição do ovo dentro do abdômen. O ovo deve estar situado antes da saída pélvica. Preferivelmente, o ovo deve estar substancialmente a meio caminho entre o aspecto caudal do externo e o osso ilíaco. A distância varia de pássaro para pássaro. Preferivelmente, a palpação é usada em combinação com raios-X, MRI ou técnicas de visualização de ultra-som.
20

De acordo com uma modalidade da invenção, o método compreende uma combinação de observação e/ou métodos físicos. Idealmente, os ditos métodos físicos incluem palpação abdominal ou pélvica, ultra-som, raios-X e/ou varredura MRI. Idealmente, os métodos de observação incluem as etapas de monitorar e registrar o padrão de postura do pássaro mãe várias vezes para produzir um tempo de transferência estimado. A seleção do método mais apropriado irá depender da destreza manual e conhecimento
30 do operador em palpação, bem como de outros fatores, como, por exemplo, o tamanho do pássaro. O refinamento adicional pode ser obtido pela obser-

vação cuidadosa do pássaro individual para determinar o tempo durante o dia que um pássaro usualmente põe um ovo; um alvo é remover o ovo próximo a e ligeiramente antecipado antes da postura do ovo.

De acordo com outra modalidade da invenção, é proporcionado um método para impedir infecção de um ovo prematuro por microorganismos que possam infectar o ovo enquanto no trato reprodutivo (incluído o ovário), mas antes que o ovo entre na cloaca. Esse tipo de infecção pode ser por via da rota transovariana. Os microorganismos podem ser impedidos de obter entrada para o ovo em desenvolvimento ou serem removidos do ovo não posto pela administração, para cada pássaro mãe e/ou o ovo, de antimicrobianos como apropriado para o microorganismo alvo. Essa modalidade proporciona um método para a remoção de contaminação do ovo prematuro não posto pela seleção de antimicrobianos conhecidos como ativos contra o microorganismo alvo na ova e sua administração para o pássaro mãe ou para o ovo não posto.

A seleção do antimicrobiano correto e sua dose, regime e rota da administração são baseados em concentrações na ova e o tempo obtido em ova específica para o estágio particular de desenvolvimento do ovo. Esses regimes e rotas de dosagem podem diferir daqueles mais tipicamente usados no tratamento de rotina de doenças comuns.

O método geralmente compreende a identificação dos microorganismos alvos pelo uso de técnicas de laboratório de identificação microbiana padrão e então a seleção dos antimicrobianos apropriados para matar os microorganismos.

A seleção dos antimicrobianos, o regime de dosagem e a rota de administração podem ser determinados pelos resultados de sensibilidade *in vitro* padrão conforme usados rotineiramente laboratórios microbiológicos clínicos que operam em padrões internacionais como, por exemplo, CLS. Para resultados ótimos, deveriam ser usados a determinação na ova de concentrações antimicrobianas e o tempo relativo ao tempo de dosagem e o estágio de desenvolvimento específico do ovo. As concentrações na ova de antimicrobianos individuais requerem dados farmacocinéticos para concen-

trações de ovo determinadas em amostras em série de ovos em estágios diferentes de desenvolvimento. Isso pode ser determinado pela administração de dose conhecida de antimicrobiano para galinha poedeira que são então sacrificadas nos pontos de tempo serial apropriado (dependendo da
5 administração do antimicrobiano, por exemplo, 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 20 e 24 horas após a administração) e as amostras apropriadas dos ovos coletados após a morte. As concentrações antimicrobianas nos ovos devem ser determinadas usando métodos convencionais adaptados e especificamente validados para uso com material de ovo.

10 Podem ser usados os antimicrobianos fluoroquinolona, cefalosporina, macrolida, para diminuir ou eliminar bactérias e "mycoplamsas", dependendo da sensibilidade antimicrobiana e da segurança nas espécies de pássaro. Devem ser administrados os antimicrobianos fluoroquinolona como enrofloxacinina para alcançar matança bactericida ou "mycoplamsal" dependente de concentração, e regimes de dosagem de uso de pelo menos aque-
15 les recomendados para uso terapêutico rotineiro. Por exemplo, enrofloxacinina de 10 a 30 mg/kg/ administrados por dia em água durante um período de 2 a 5 horas. Os antimicrobianos cefalosporina e macrolida devem usar regimes de dosagem para assegurar exposição máxima com base na matança bactericida dependente do tempo. Podem ser usadas outras classes de antimicro-
20 bianos.

Tais microorganismos podem ser impedidos de obter acesso ao ovo em desenvolvimento a partir do ovo não posto pela administração de antimicrobianos ao pássaro mãe e/ou ao ovo, conforme apropriado para os
25 microorganismos alvo. Os antimicrobianos são usualmente administrados oralmente (por gavagem ou na alimentação ou na água) ou parentalmente por vias subcutâneas, intramusculares ou intravenosas. O ultra-som guiado ou injeção direta de laparoscópica no ovo em desenvolvimento é então também possível.

30 O ideal é que o ovo seja removido cirurgicamente em uma maneira estéril do abdômen do pássaro mãe.

A invenção proporciona adicionalmente um método no qual a

remoção cirúrgica compreende:

realizar uma incisão de laparotomia e atando o oviduto no pássaro em ambas as extremidades com suturas;

transeccionar o oviduto distal para cada sutura;

5 remover o ovo encerrado no oviduto;

esterilizar o oviduto;

remover o ovo; e

esterilizar o ovo.

10 Alternativamente, o método de remoção cirúrgica pode compreender:

fazer uma incisão na pele do pássaro;

manipular o útero para a superfície; e

fazer uma incisão no útero para remover o ovo e o útero ou prender o útero e remover o ovo.

15 Quando o útero é preso e o ovo é removido, o útero pode ser reparado de maneira que o pássaro seja capaz de por mais ovos. Esse aspecto é importante na situação em que o pássaro mãe é valioso e não deva ser sacrificado. Nessa situação o pássaro é anestesiado. Alternativamente, o pássaro pode ser sacrificado antes da remoção estéril do ovo.

20 É aconselhável que a remoção cirúrgica estéril do ovo seja completada rapidamente, em torno de menos de 30 minutos do tempo da eutanásia ou da anestesia, para evitar deterioração da viabilidade do embrião. O uso prolongado de anestésicos ou de demoras excessivas entre a eutanásia do pássaro mãe e a remoção do ovo irá afetar adversamente a viabilidade do embrião.

25 Uma vez que o ovo tenha sido removido o pássaro mãe é então chocado em um ambiente estéril e incubado para produzir um pássaro de postura.

30 Essencialmente, o que a presente invenção faz é proporcionar o uso de ovos obtidos artificialmente de pássaros mãe na produção de ovos e pássaros obtidos para proporcionar pássaros de postura para o controle de microorganismos. Os ditos ovos e pássaros são apropriados para sua utili-

dade subseqüentemente incubados, criados, mantidos e reproduzidos, ou convencionalmente, ou em alguma forma de ambiente isolador ou estéril.

5 Idealmente, cria-se o pássaro como um pássaro mãe em um ambiente estéril, alimentado o pássaro com comida estéril. Então, o ovo é removido do pássaro mãe artificialmente antes de transferir o ovo para uma área de contaminação potencial no pássaro mãe e então o ovo é chocado e incubado para produzir um pássaro de postura que é mantido nesse ambiente estéril.

10 Em uma modalidade da invenção, o pássaro mãe é escolhido de um bando de pássaros similares todos criados sob as mesmas condições.

Em outra modalidade da invenção, o pássaro mãe é incubado naturalmente em um ambiente estéril a partir de um bando de pássaros de status livre de contaminação similar existente.

15 Em uma modalidade adicional da invenção, o pássaro mãe é um de um bando de pássaros que são de outro status livre de contaminantes tendo sido produzidos por seleção adequada e métodos de criação natural sob condições controladas e o método é usado para proporcionar pássaros de diferentes status livres de contaminantes.

20 Preferivelmente, um pássaro de postura é parte de um bando e após os pássaros de postura terem sido incubados, uma amostra dos pássaros de postura é removida e testada para contaminantes específicos para proporcionar uma medição do status livre de contaminantes do bando. Idealmente, quando o status livre de contaminante especificado não é alcançado no pássaro de postura, o pássaro de postura é usado como um pássaro
25 mãe no método. Por meio de um processo iterativo, será possível produzir eventualmente um bando de pássaros que será virtualmente estéril e de status livre de germe.

30 Em uma modalidade, o pássaro de postura é removido do ambiente estéril para por ovos que são, em seqüência, incubados para produzir pássaros de postura adicionais.

Em outra modalidade, o pássaro de postura é removido do ambiente estéril e alimentado com comida contendo flora intestinal normal não

patogênica. Os pássaros produzidos por esse método, sendo dotados de flora intestinal normal, podem ser mantidos em baixo custo e são adequados para consumo ou uso na indústria alimentícia.

5 Em uma modalidade adicional, os ovos livres de germe de frangos ou de pássaros adultos podem ser infectados com organismos não patogênicos selecionados (incluindo bactérias ou parasitos probióticos em potencial), ou patógenos ou combinações de não patogênicos e patógenos. Os ovos e pássaros assim produzidos podem ser usados, por exemplo, para investigação científica de interações de hospede patógeno, interações hós-
10 pede comensal e descoberta e desenvolvimento de tratamento de novas doenças e métodos e produtos de prevenção para aplicação ou em pássaros ou em mamíferos.

Tipicamente, o pássaro é um frango. Apesar desse método poder ser realizado em todos os pássaros.

15 Enquanto a descrição acima estava inteiramente relacionada a aves domésticas e especificamente a galinhas, deve ser observado que a presente invenção pode ser realizada em outros pássaros.

Preferivelmente, quando um pássaro é incubado de um pássaro de postura sendo dotado de status livre de contaminante especificado e não
20 é um pássaro de postura, o pássaro posto dessa forma é criado em um ambiente estéril para subsequente fertilização de pássaros de postura do mesmo status mais baixo livre de contaminante.

A invenção também proporciona um ovo e um pássaro produzidos por quaisquer dos métodos da invenção.

25 De acordo com um aspecto adicional da invenção, a invenção proporcionar adicionalmente um método para proporcionar um ovo de um status livre de contaminante especificado compreendendo um ambiente estéril:

30 alojar um pássaro de postura sendo dotado do mesmo ou de melhor status livre de contaminação conforme proporcionado de acordo com o método da invenção;

usar o pássaro de postura para por o ovo; e

remover o ovo para outro ambiente estéril.

Idealmente, o ovo é, ao ser posto, imediatamente removido e a casca do ovo é esterilizada.

5 O pássaro de postura pode então ser usado para por um ovo, que pode ser o próprio produto final, ou que pode incubar em um pássaro que poderia formar um bando de pássaros de status livre de germe ou se não for um pássaro de postura, ser usado para fertilizar um pássaro de postura.

10 Preferivelmente, o pássaro é anestesiado ou sacrificado por eutanásia ou matança antes da remoção do ovo de sua casca. Os pássaros mãe fêmea podem ser vivos ou recém mortos. Os pássaros vivos podem, de acordo com a ética, legal e considerações do bem-estar animal, estar totalmente consciente, sedado ou anestesiado. Os ovos e a ova podem ser fertilizados ou não fertilizados.

15 Os organismos infecciosos que podem ser controlados pela invenção incluem organismos que podem ser patogênicos ou não patogênicos para as espécies relevantes. Esses incluem espécies de pássaros (tipicamente frangos, aves comestíveis e perus), seres humanos ou outros mamíferos (tipicamente cachorros, gatos, cavalos, gado, porcos, carneiro, cabras, 20 ratos e camundongos). Para a finalidade da invenção, os microorganismos incluem parasitos, bactérias (incluindo espécies aeróbicas e anaeróbicas, espécies comensais e espécies associadas ao intestino), micoplasma, vírus (incluindo retrovírus), príons, fungos, leveduras, mofo e fragmentos de DNA e RNA.

25 Se os ovos férteis forem usados para produzir cria ou pássaros obtidos, então os ovos podem ser incubados, criados, mantidos e reproduzidos ou em sistemas de cultivo agrícola convencional, sistemas SPF ou em isoladores para controlar a entrada de microorganismos e manter o status livre de germe.

30 De acordo com a invenção, para liberdade máxima dos ovos de microorganismos é preferível ser derivado assepticamente de mães (a menos que os mesmos sejam também livres de germe ou gnotobióticos) e o

ciclo de vida deve ser completado em isoladores. O ciclo de vida pode ser completado fora dos isoladores quando são produzidos os ovos SPF e os pássaros.

5 De acordo com a presente invenção, a derivação asséptica de ovos e, se incubação, criação, manutenção e reprodução de pássaros apropriada pode ser usada em combinação com outro método de controle de contaminação microbiana. Tais métodos incluem desinfetantes, antimicrobianos, antibióticos, agentes antivírus, antiparasíticos, antibióticos, agentes antivirais, antiparasíticos, imunomoduladores e vacinas.

10 Deve ser observado que em determinadas circunstâncias, ao tomar os pássaros selecionados como pássaros pais, os pássaros de postura produzidos podem não estar suficientemente livres de contaminantes para produzirem pássaros de postura de qualidade correta. Pode então ser necessário realizar novamente as mesmas etapas produzidas dos tais pássaros de postura e remover artificialmente os ovos desses pássaros de postura
15 para proporcionar pássaros de postura adicionais que esperançosamente estarão livres de contaminantes.

Deve ser observado que os quando são incubados pássaros que não são pássaros de postura, os mesmos serão então retidos para subsequente fertilização dos pássaros de postura. Dessa maneira, todo o bando
20 pode ser estéril.

É possível, na presente invenção, produzir simplesmente os ovos para uso subsequente. Quando são exigidos ovos livres de status livre de germe, a primeira coisa a fazer é incubar os ovos obtidos cirurgicamente
25 dos pássaros pais.

A criação e a reprodução de um pássaro em um estado saudável e produtivo e ao mesmo tempo mantido em um ambiente livre de contaminação especificada e estéril requerem dietas especializadas para compensar a falta de determinados nutrientes normalmente produzidos, por exemplo, pelos contaminantes encontrados no intestino ou na pele de um
30 pássaro em um ambiente convencional.

Ainda de acordo com uma modalidade adicional da invenção, é

proporcionado um método para obter produtos biológicos terapêuticos e profiláticos obtidos de ovos estéreis produzidos de acordo com a invenção. Tais produtos incluem vacinas (vivas e mortas), anticorpos, anticorpos monoclonais como, por exemplo, interferon, proteínas terapêuticas e profiláticas e outros produtos biológicos similares que são todas produzidas por técnicas bem conhecidas. Podem também ser produzidos os antígenos para teste serológico ou outros testes diagnósticos. Os ovos podem ser usados para cultura de tecido / célula e meio de produção e em uso de pesquisa. O uso de ovos para a produção de, por exemplo, anticorpos monoclonais, têm a vantagem de que os anticorpos ou outras proteínas produzidos são dotados de alta atividade, são da mesma forma que os anticorpos humanos em termos de, por exemplo, glicolização. Além disso, os custos relacionados à purificação do produto de proteína resultante / anticorpo monoclonal podem ser reduzidos uma vez que a remoção dos organismos vivos, e produtos tóxicos ou de contaminação obtidos dos mesmos requerem processamento adicional, e freqüentemente caros, que também freqüentemente provocam produções inferiores e/ou potência de proteína alvo.

Opcionalmente, o pássaro mãe pode ser um pássaro transgênico (isto é, um pássaro transgenicamente modificado para conduzir DNA exógeno) que dará origem a um ovo que produz uma proteína exógena ou outras substâncias.

Há um risco de vacinas de contaminação com patógenos que são transmitidos através de ovos embrionados. No passado, para que a produção da vacina fosse bem sucedida, usando embriões de bandos livres de patógeno específico (SPF) minimizado o risco e alternativa ou adicionalmente os bandos foram mantidos em ambiente muito limpo. Esse novo método de produção de ovos de status livre de germe assegura que os ovos usados na produção de vacina são estéreis e superam a contaminação e os problemas estéreis que podem resultar em vacinas consideradas inseguras para uso humano ou animal. Esse novo método proporciona uma fonte alternativa de ovos estéreis que não estão contaminados por microorganismos. Isso tem a vantagem de superar os problemas anteriormente encontrados com

relação à contaminação.

Os ovos produzidos de acordo com a invenção podem ser usados para isolar um microorganismo patogênico, produzir uma vacina, anticorpos, anticorpo monoclonal e outras moléculas terapêuticas e profiláticas, como, por exemplo, peptídeos e proteínas e produzir antígenos para uso em testes serológicos.

A produção de ovo de uma vacina contra um microorganismo como, por exemplo, um vírus geralmente ocorre por via do método seguinte. A cepa de vírus apropriada é selecionada e então adaptada para crescer nos ovos. Essas cepas de vírus adaptada são injetadas em ovos fertilizados, que são substancialmente chocados para possibilitar o crescimento do vírus. Grandes quantidades do vírus podem então ser coletadas do ovo antes que o mesmo alcance o estágio de incubação. O vírus coletado pode então ser misturado e processado através de várias etapas para eventualmente produzir uma vacina totalmente formulada tanto para humano quanto vacinação animal, conforme apropriado. Grandes grupos de até vários milhões de ovos são coletados, processados e combinados para formar um produto de vacina. Os números substanciais dos ovos são usados para a criação de sementes de vírus para iniciar a infecção dos ovos com o vírus alvo e também para avaliar a segurança da vacina, por exemplo, para confirmar a ausência de agentes estranhos ou processamento inapropriado do vírus alvo na vacina.

Deve ser compreendido que a vacina pode ser composta de microorganismos patogênicos mortos, cepas vivas de microorganismo, cepas recombinantes, subunidades e/ou antígenos específicos isolados.

Ainda de acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um método para a produção de pássaros semi-estéreis microbiológicos ou pássaros livres especificados de patógenos específicos para reabastecimento de bandos de pássaro. Isso é particularmente valioso onde a criação convencional e/ou os bandos de SPF quebraram e se tornaram infectados com patógenos especificados. Nessas circunstâncias um dos métodos mais rápidos e eficazes para recriar bandos SPF é derivar um novo

bando de bandos infectados existentes, pelo uso dos mesmos produzir ovos livre de germe obtidos de uma maneira estéril de pássaros resguardados e selecionados do bando infectado. Essa abordagem é particularmente valiosa quando os pássaros infectados são de genética especial ou mérito transgê-
5 nico. Isso é particularmente aplicável para bandos de pássaros que foram infectados com, por exemplo, vírus de gripe aviária ou algumas espécies bacterianas como, por exemplo, salmonela.

A gripe aviária é uma doença contagiosa de aves comestível. Enquanto todas as espécies de pássaros são sujeitos a serem suscetíveis,
10 os bandos de aves domésticas são especialmente vulneráveis às infecções que podem rapidamente atingir proporções epidêmicas. As medidas de controle mais importantes incluem a rápida destruição de pássaros expostos, remoção apropriada das carcaças e a quarentena e rigorosa desinfecção dos bandos de pássaros remanescentes. O método da presente invenção
15 para a produção de pássaros livres de germe é aplicável à situação onde tenha havido uma epidemia de tal vírus e os bandos de pássaro precisem ser reabastecidos. Esse método proporciona um método seguro e confiável para o reabastecimento de bandos de pássaros que são estéreis ou pelo menos semi-estéreis ou de status especificado incluindo liberdade de micro-
20 organismos específicos incluindo vírus da gripe aviária.

O método para a produção de ovos livres de germe, semi-estéreis ou livres de patógeno específico para reabastecimento de bandos de pássaros compreende o método de quaisquer reivindicações precedentes onde o pássaro mãe é obtido ou do bando de pássaros a ser reabastecido
25 ou de uma alternativa adequada, o pássaro de postura produzidos dos mesmos e de acordo com o método da invenção é testado para proporcionar uma medida de status livre de germe uma vez que o status livre de germe desejado tenha sido obtido o pássaro de postura é usado para produzir usando o método reivindicado, prole para formar um bando de pássaros de
30 status livre de germe apropriado.

Alternativamente, o pássaro e os ovos podem ser proporcionados para alimento e uso de consumo humano, ou uso animal como, por e-

xemplo, em uma situação especificada para pacientes particularmente frágeis com suscetibilidade maior do que a usual à infecção ou para qualquer animal ou ser humano onde seja desejável evitar uma infecção.

5 Deve ser compreendido que essa invenção se aplica a todas as espécies aviárias e reptilianas, incluindo, mas não se limitando a, frangos, perus, codorna, patos, gansos, galinha-d'angola, faisão, perdiz, papagaio e galo silvestre.

A invenção será mais claramente compreendida a partir da descrição que se segue do método de acordo com a presente invenção.

10 Exemplo 1

Método

Um bando de cinqüenta frangos fêmeas adultas e cinco macho adultos do status SPF conhecido foi mantido em dietas selecionadas e permitidos a reproduzir naturalmente. A cronometragem da postura do ovo (ovi-
15 posição) foi registrada individualmente para cada fêmea durante um período de duas semanas. O tempo médio do dia (tempo, L) quando um ovo foi posto foi calculado para cada fêmea. O tempo do dia para L-3h foi calculado e o período de L-3 para L foi indicado como o intervalo de derivação. O intervalo era o tempo no qual foi realizada a laparotomia cirúrgica asséptica dos ovos
20 mais desenvolvidos em cada pássaro.

Para o procedimento, os pássaros foram sacrificados pelo deslocamento cervical e preparados logo em seguida. Os pássaros foram submersos em uma solução desinfetante por 5 minutos. Foram removidas as penas do tórax ventral e do abdômen e a pele exposta esterilizada usando
25 uma solução de 50% de iodina em álcool aquecido a 37°C. Cada pássaro foi então colocado sob um isolador cirúrgico especialmente adaptado esterilizado com uma solução de 5% de ácido peracético e contendo instrumentos estéreis e um frasco de 500 ml contendo iodina em álcool. O pássaro foi coberto com um cortinado estéril e um orifício de entrada estéril do isolador foi
30 então colocado sobre o cortinado. A incisão de laparotomia foi feita e o oviduto (tipicamente o útero) foi amarrado em ambos os lados do ovo usando material de sutura. O oviduto foi então transeccionado distal para cada das

suturas do ovo e o oviduto contendo o ovo foi removido do abdômen da fêmea. O ovo encerrado no útero foi então colocado na solução iodina / álcool por cinco minutos após os quais o ovo encerrado no oviduto foi transferido por via de um orifício de entrada do isolador cirúrgico para um isolador receptor. No isolador receptor, o oviduto foi aberto, o ovo removido, esfregado com uma solução desinfetante e transferido para um isolador adaptado como um incubador de chocadeira.

Em um dia de chocamento, os frangos vivos foram removidos do isolador de chocadeira e transferidos para dois isoladores de criação em grande escala para criar grupos de crias de frangos. Os frangos foram criados em dietas comerciais esterilizadas por radiação. Com 18 dias de idade cinco frangos foram removidos de cada isolador de criação, sacrificados e amostrados bacteriologia por cultura aeróbica e anaeróbica. As amostras incluíam fígado, baço, sangue cardíaco, vagina / cloaca, cecal, e pequenas digesta intestinal e fezes.

Resultados

Os frangos viáveis foram incubados com sucesso a partir dos ovos obtidos artificialmente (capacidade de incubação > 50%, mais frequentemente > 90%). Nenhuma bactéria anaeróbica ou aeróbica foi isolada dos frangos amostrados.

Conclusão

Foi estabelecido um método seguro para produção artificial de ovos férteis livres de germe em frangos. Os ovos foram produzidos de frangos viáveis livres de germe que foram mantidos com sucesso em isoladores. O método acima, descrito no Pedido de patente Europeu No. 01650109, possibilita claramente a produção de frangos livres de germe. Contudo, o uso repetido do método indicado cujos resultados foram altamente variáveis e frequentemente forneceram capacidade de incubação baixa (por exemplo, <30%) que geralmente não é aceitável comercialmente.

Exemplo 2

Uma série de estudos adicionais, realizados por cerca de um período de 2 anos, foram conduzidos de acordo com o protocolo do Exemplo

1 a fim de aperfeiçoar e refinar o método do Exemplo 1.

Um total de 100 pássaros, em seis bandos de idades e genótipos variados, foram usados em uma série de pequenos estudos (cada um usando de 9 a 20 pássaros) para derivar ovos livres de germe. Durante esse
5 tempo os resultados tanto da capacidade de incubação quanto do status livre de germe microbiológico dos frangos foram muito variáveis com a capacidade de incubação variando de zero a 40%. Isso foi marcadamente inferior ao resultado anteriormente encontrado. Outro fator de frustração foi a falha em alguns estudos para obter um status livre de germe devido à contamina-
10 ção microbiológica durante os procedimentos para derivar o ovo. Em consequência disso, o tempo despendido para derivar um ovo após a indução da anestesia ou da eutanásia aumentou freqüentemente em um esforço para assegurar a esterilidade.

Portanto, foram feitas várias investigações (Exemplo de 2A a
15 2D) para avaliar os efeitos de várias diferenças no procedimento de remoção do ovo, na capacidade de incubação e no status microbiológico dos frangos dos ovos obtidos. Essas variáveis incluem o tempo a partir da indução de eutanásia ou anestésica para remoção do ovo do abdômen da mão, e da cronometragem da remoção do ovo com relação ao tempo antecipado da
20 postura do ovo e o estágio de desenvolvimento / maturidade do ovo no trato reprodutivo. As avaliações incluíam imaturidade do ovo (por exemplo, cascas macias ou ovo imaturo demais para ser removido intacto), capacidade de incubação, esterilidade e facilidade de manipulação dos tecidos (o último provocando um aumento substancial no tempo a partir da eutanásia / anestesia para a remoção de um ovo). As variáveis foram avaliadas individual-
25 mente.

Foram avaliadas nesse exemplo as variáveis que afetam a esterilidade e a viabilidade de ovos férteis obtidos por laparotomia estéril. As avaliações feitas nos estudos e os resultados obtidos estão proporcionados
30 abaixo.

Exemplo 2A

Os efeitos de diferença no tempo entre a posição do ovo espe-

rada e a remoção cirúrgica estéril do ovo do pássaro mãe na viabilidade e esterilidade do ovo e facilidade de manipulação cirúrgica.

Resultados

Capacidade de Incubação:

5 controle (ovos postos naturalmente) de 85 a 100% de incubação, de 80 a 100% de esterilização;

 ovos removidos do útero dentro de 30 minutos de anestesia ou eutanásia, de 13 a 40% de incubação, de 80 a 100% de esterilização;

10 ovos removidos do útero 60 minutos após a eutanásia, 14% de incubação, de 80 a 92 % de esterilização.

 Esses resultados estabelecem a viabilidade de ovos prematuros em galinhas diminuir com o tempo após a eutanásia.

Facilidade de Manipulação Cirúrgica:

 Controle não aplicável;

15 30 minutos conforme acima, bom, tecidos facilmente levantados; 60 minutos como acima, difícil, tecidos difíceis para levantar / rigidez causada por morte prematura.

20 Esses resultados estabelecem que a remoção cirúrgica estéril de ovos em um isolador cirúrgico livre de germe é facilitada pelo termino da cirurgia em 30 minutos.

Exemplo 2B

25 Os efeitos da posição de ovos cronometrada *versus* palpação *versus* a combinação dessas técnicas na proporções de ovos com cascas completas *versus* cascas moles, a viabilidade (usualmente os frangos vivos no tempo de incubação) e em facilidade de manipulação cirúrgica.

Resultados

 Apenas cronometragem, cascas moles e nenhum ovo adequado para remoção de 8 a 71%, viabilidade de 13 a 50%, esterilidade de 75 a 100%, facilidade de manipulação cirúrgica, variável;

30 Apenas palpação, cascas moles e nenhum ovo adequado para remoção de 13 a 71%, viabilidade de 13 a 54%, esterilidade de 89 a 100%, facilidade de manipulação cirúrgica, bom;

Cronometragem combinada com palpação, cascas moles e nenhum ovo adequado para remoção de 10 a 23%, viabilidade de 14 a 57%, esterilidade de 92 a 100%, facilidade de manipulação cirúrgica, bom.

5 Esses resultados sugerem que a palpação ou a palpação combinada com cronometragem pode ter algumas vantagens sobre apenas a cronometragem, especialmente em termos de facilidade de manipulação na ocasião da remoção do ovo do abdômen. Análises adicionais dos dados indicaram que a cronometragem mais a palpação tendem a ser associadas em períodos mais curtos para remoção de ovo e que a apenas a cronometragem foi associada com os períodos mais longos refletindo um número menor de cascas moles no grupo de cronometragem mais a palpação. O número menor de cascas moles facilita a manipulação mais fácil e mais rápida durante a remoção do ovo.

Exemplo 2C

15 Os efeitos de antibióticos (por exemplo, fluoroquilonas administradas oralmente) na eliminação de bactérias transovarianas e infecções micoplasmal e na viabilidade e esterilidade de embriões e frangos subsequentes.

Resultados

20 Sem antibióticos, viabilidade de 22 a 60%, e esterilidade de 66 a 92%;

Com antibióticos, viabilidade de 13 a 57%, e esterilidade de 89 a 100%.

25 Esses resultados estabelecem o benefício do uso de antibióticos para remover infecção transovariana (por exemplo, salmonela) e ausência de efeitos adversos na viabilidade de ovos obtidos livres de germe.

Exemplo 2D

30 Os efeitos do tempo (zero a 180 minutos) entre a eutanásia e a remoção do ovo na viabilidade de na facilidade de manipulação, capacidade de incubação e esterilidade.

Resultados

Esterilidade 100%,

Manipulação muito mais difícil após 30 minutos,

A capacidade de incubação foi de 20, 40 e 80%, para os ovos removidos 60, 40 e 20 minutos após a eutanásia (n= 10 por hora).

5 Esses resultados estabelecem que a remoção estéril de ovos do abdômen de pássaros em um isolador cirúrgico livre de germe é facilitada pelo término da cirurgia em aproximadamente 30 minutos.

Exemplo 3

Uma revisão dos resultados das investigações nos Exemplos de 2A a 2D sugere que a maior capacidade de incubação e esterilidade micro-
 10 biológica de ovos obtidos foi mais provavelmente obtida com os pássaros nos quais foi praticada a eutanásia (os pássaros anestesiados sendo mais difícil de serem manipulados), nos quais o ovo foi removido o mais rápido possível após a eutanásia (dentro de 15 a 30 minutos) e nos quais a casca do ovo estava firmemente e bem formada (maturação de ovo bem avançada,
 15 nenhuma casca mole) com base em uma combinação de ovo cronometrado e palpação manual. Com base em outros dados usados para definir condições de incubação ótimas para ovos obtidos prematuros, uma umidade relativamente baixa (aproximadamente 25%) foi selecionada para os primeiros 18 dias de incubação. Esse método descrito acima foi uma investigação con-
 20 firmatória onde todas as variáveis identificadas no Exemplo 2 foram colocadas juntas em uma maneira ótima para estimar as interações entre essas variáveis.

Método e Materiais:

Um total de 180 frangos de reprodução fêmeas adultas do status
 25 SPF conhecido em 7 grupos sucessivos (de idades e genótipos variados) foram mantidos em dietas selecionadas e permitidas para reproduzir naturalmente. Foi usada uma combinação de cronometragem e palpação para determinar o tempo ótimo para remoção do ovo do abdômen dos pássaros.

30 Para o procedimento, foi praticada eutanásia em pássaros por deslocamento cervical e os mesmos preparados para a remoção dos ovos. Foram removidas as penas do tórax ventral e do abdômen e a pele exposta esterilizada usando uma solução de 50% de iodina em álcool. Cada pássaro

foi então colocado sob um isolador cirúrgico especialmente adaptado esterilizado com uma solução de 50% de ácido peracético e contendo instrumentos estéreis. O pássaro foi coberto com um cortinado adesivo estéril e um orifício de entrada estéril do isolador foi então colocado sobre o cortinado.

- 5 Foi feita uma incisão de laparotomia e seguindo dissecação cuidadosa o ovo foi removido do útero / aspecto distal do trato reprodutivo e proximal da cloaca. O ovo foi então transferido sob condições livres de germe para um isolador adaptado como um incubador chocadeira. Foi recuperado com sucesso um total de 153 ovos com cascas boas de 13 a 32 minutos após a eutanásia, e foram considerados adequados para incubação.

- 10 Após o armazenamento por aproximadamente de 6 a 24 horas, em uma bandeja de ovo plástica ventilada, livre de vibração, a 18 a 20°C, os ovos foram pesados e então colocados em pequenos incubadores de balanço. Os incubadores foram mantidos em um RH de aproximadamente 25% RH e a 37,6°C. Os ovos eram célula de ar presa no ponto mais alto e foram
- 15 peados individualmente no primeiro, no sétimo e no décimo oitavo dia de incubação. No décimo oitavo dia, todos os incubadores foram ajustados para proporcionar um RH de aproximadamente 65%. O número de ovos que foram a casca de frangos viáveis vivos foi recorde.

- 20 Dentro de sete dias de incubação, os frangos vivos foram removidos do isolador de chocadeira e transferidos para isoladores de criação em grande escala adequados para criar grupos de crias de frango. Os frangos foram criados com dietas comerciais suplementadas esterilizadas por radiação. Quando os frangos estavam entre 14 e 21 dias de idade, foram removi-
- 25 das amostras fecais e mechas de cada isolador de criação e amostrados para bacteriologia pó cultura enriquecida por aeróbica e anaeróbica.

Resultados:

- 30 Foram incubados com sucesso frangos viáveis dos ovos prematuros obtidos artificialmente. Não foi isolada das amostras nenhuma bactéria aeróbica ou anaeróbica. (Os ovos postos naturalmente pelos pássaro de postura dentro de 9 dias antes da eutanásia eram dotados de uma capacidade de incubação de frango viável de 86%. Isso confirma que um nível

normal ou alto de fertilidade natural nos ovos produzidos pelas fêmeas).

A capacidade de incubação dos 7 grupos de ovos livres de germe variou de 60% (9 de 15) a 77% (17 de 22), com uma média de 74%.

Conclusão

5 Foi estabelecido um método seguro e altamente eficaz para produção artificial de ovos livres de germe. Os ovos eram férteis e produzidos de frangos viáveis livres de germe que foram mantidos com sucesso em isoladores. O estudo confirmou o uso de um grande número de ovos através de 7 bandos sucessivos de frangos que, comparado com os métodos anteriormente descritos para a produção de ovos férteis livres de germe, pode ser obtida menor variabilidade na capacidade de incubação de ovos obtidos e 100% de status microbiológico consistente livre de germe pela seleção de pássaros com um ovo que é bem maturado (próximo ao tempo de postura natural; seleção baseada na combinação de cronometragem de postura de 15 ovo e palpação), removendo rapidamente o ovo do pássaro mãe (de 15 a 30 minutos do início da eutanásia ou anestesia) e então incubados em RH de aproximadamente 25% (mais inferior do que para ovos postos naturalmente).

20 Usando as técnicas descritas na presente aplicação, é possível alcançar índices de incubação alta mais consistente, que é índice de capacidade de incubação consistentemente maior do que 60%. Isso não foi possível antes de tal consistência de base.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para aumentar a capacidade de incubação e viabilidade de ovos de status livre de germe quando obtidos de um pássaro mãe que é realizado em um ambiente estéril antes da remoção de um ovo prematuro em sua casca de um pássaro mãe e que inclui as seguintes etapas:
- 5
- a) alojar um pássaro como um pássaro mãe;
 - b) determinar a cronometragem de quando remover o ovo prematuro do pássaro mãe por:
 - (i) determinar a posição do ovo prematuro no trato reprodutivo do pássaro mãe antes da transferência do ovo prematuro para a cloaca do pássaro mãe; e
 - (ii) estabelecer quando o nível de requisito da formação da casca do ovo e a calcificação ocorreu pela determinação do estágio de desenvolvimento do ovo prematuro em termos de formação de casca e de calcificação.
- 10
- 15
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que a etapa (b) ocorre por uma combinação métodos de observação e/ou físicos.
3. Método, de acordo com a reivindicação 2, em que os métodos físicos incluem palpação abdominal e pélvica, ultra-som e raios-X e/ou varredura MRI.
- 20
4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o método possibilita, antes da remoção do ovo prematuro do pássaro mãe, a determinação da localização do ovo prematuro antes da saída pélvica do pássaro mãe.
- 25
5. Método, de acordo com a reivindicação 4, que possibilita determinar se o ovo prematuro está substancialmente a meio caminho entre o aspecto caudal do externo e o osso ilíaco do pássaro mãe.
- 30
6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que os métodos de observação incluem as etapas de monitorar e registrar o padrão de postura do pássaro mãe várias vezes para produzir um tempo de transferência estimado do ovo para o trato reprodutivo distal e para a cloaca.

7. Método de criação de um pássaro de status livre de germe, compreendendo, em um ambiente estéril

a) alojar um pássaro como um pássaro mãe;

b) determinar a cronometragem de quando remover o ovo prematuro em sua casca do pássaro mãe por:

i. determinar a posição do ovo prematuro no trato reprodutivo do pássaro mãe antes de transferir o ovo prematuro para a cloaca do pássaro mãe; e

ii. estabelecer quando o nível de requisito de formação de casca de ovo e de calcificação ocorreu pela determinação do estágio de desenvolvimento do ovo prematuro em termos de formação de casca e de calcificação.

c) remover o ovo prematuro em sua casca do pássaro mãe quando o nível de requisito de formação e de calcificação de casca de ovo tiver ocorrido e antes de transferir o ovo prematuro para a cloaca no pássaro mãe; e

d) chocar o ovo prematuro em sua casca e incubar o ovo prematuro para produzir um pássaro de postura.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, em que a etapa (b) ocorre pela combinação de métodos de observação e/ou físicos.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, em que os ditos métodos físicos incluem palpação abdominal e pélvica, ultra-som, raios-X e/ou varredura MRI.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 9, em que o método possibilita a determinação do local do ovo prematuro antes da saída pélvica do pássaro mãe antes da remoção do ovo prematuro do pássaro mãe.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que o ovo prematuro é removido quando o ovo prematuro está substancialmente a meio do caminho entre o aspecto caudal do externo e o osso íliaco do pássaro mãe.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de

7 a 11, em que os métodos de observação incluem as etapas de monitorar e registrar o padrão de postura do pássaro mãe várias vezes para produzir um tempo de transferência estimado do ovo para o trato reprodutivo distal e para a cloaca.

5 13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 12, no qual a remoção do ovo prematuro ocorre antes e o mais próximo possível do tempo de transferência quando o ovo seria transferido naturalmente para a cloaca no pássaro mãe.

10 14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 13, compreendendo adicionalmente a etapa de remover microorganismos que infectam o ovo prematuro enquanto no trato reprodutivo.

15 15. Método, de acordo com a reivindicação 14, compreendendo as seguintes etapas:

15 i. identificação de microorganismos alvo que infectam o ovo prematuro enquanto no trato reprodutivo;

15 ii. seleção do antimicrobianos apropriados para combater os microorganismos alvo, como, por exemplo, fluoroquinolona, cefalosporina e antimicrobianos macrolida; e

20 iii. administração do antimicrobiano para pássaro mãe e/ou para o ovo prematuro na ova.

25 16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 15, em que a infecção do ovo prematuro no trato reprodutivo ocorre por via da rota transovariana.

25 17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 14 a 16, em que o nível de dosagem do antimicrobiano é determinado na ova.

30 18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 17, em que o pássaro mãe é sacrificado, submetido à eutanásia, ou anestesiado e a remoção do ovo prematuro na etapa (c) é realizada em menos de aproximadamente 30 minutos do tempo do sacrifício, eutanásia ou anestesia do pássaro mãe.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações

precedentes, no qual o pássaro mãe é escolhido de um bando de pássaros similares, todos criados sob as mesmas condições.

5 20. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, no qual o pássaro mãe é incubado naturalmente em um ambiente estéril a partir de um bando de pássaros de existência similar do status livre de contaminação.

10 21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, no qual o pássaro mãe é um de um bando de pássaros que são de outro status livre de contaminação tendo sido produzidos por seleção adequada e métodos de criação naturais sob condições controladas e o método é usado para proporcionar pássaros de um status livre de contaminação diferente.

15 22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 21, no qual o pássaro de postura forma parte de um bando e após os pássaros de postura serem incubados, uma amostra dos pássaros de postura é removida e testada para contaminantes específicos para proporcionar uma medida do status livre de contaminante do bando.

20 23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 22, no qual quando o status livre de contaminante especificado não é alcançado no pássaro de postura, o pássaro de postura é usado como um pássaro mãe no método.

25 24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 23, no qual o ovo é removido cirurgicamente do abdômen do pássaro mãe.

25 25. Método, de acordo com a reivindicação 24, compreendendo as etapas de:

30 i. fazer uma incisão na pele do pássaro;
ii. manipular o útero para a superfície; e
iii. fazer uma incisão no útero e remover o ovo ou prender o útero e remover o ovo.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 25, em que a remoção do ovo prematuro de um pássaro mãe anestesia-

do, submetido à eutanásia ou sacrificado ocorre em um ambiente estéril e a esterilidade do procedimento é verificada durante todo o procedimento.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 26, no qual o pássaro de postura é removido do ambiente estéril para por 5 ovos que são, em seqüência, incubados para produzir pássaros de postura adicionais.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 27, no qual o pássaro de postura é removido do ambiente estéril e alimentado com alimento contendo flora intestinal normal.

10 29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, no qual o pássaro é um frango.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 7 a 29, no qual quando um pássaro é incubado a partir de um pássaro de postura sendo dotado de status livre de contaminante especificado e não é 15 um pássaro de postura, o pássaro assim posto é criado em um ambiente estéril para subsequente fertilização de pássaros de postura do mesmo ou de status livre de contaminante inferior.

31. Método de provimento de um ovo de status livre de germe em um ambiente estéril compreendendo:

20 i. alojar um pássaro de postura sendo dotado do mesmo ou de melhor status livre de germe, conforme provido como definido no método de qualquer uma das reivindicações de 7 a 30;

ii. usar o pássaro de postura para por o ovo; e

iii. remover o ovo para outro ambiente estéril.

25 32. Método, de acordo com a reivindicação 31, no qual o ovo é, ao ser posto, imediatamente removido e a casca do ovo é esterilizada.

33. Ovo produzido de acordo com o método da reivindicação 31 ou 32.

30 33. Pássaro incubado de um ovo, como definido na reivindicação 33.

35. Pássaro incubado como definido no método das reivindicações de 7 a 30.

36. Pássaro incubado de um ovo posto por um pássaro de postura criado como definido no método de qualquer das reivindicações de 7 a 30.

5 37. Uso de ovos produzidos de acordo com qualquer uma das reivindicações de 31 a 33 na produção de substâncias biológicas terapêuticas e profiláticas, como, por exemplo, vacinas, anticorpos, anticorpos monoclonais, fibroblasto, proteína e/ou antígenos para teste serológico ou outros produtos de proteína similares.

10 38. Uso, de acordo com a reivindicação 37, na produção de uma vacina onde o ovo é injetado com uma cepa de vírus selecionada, o ovo é então incubado para produzir um vírus e o vírus produzido a partir do mesmo forma uma vacina.

39. Uso, de acordo com a reivindicação 37, em que o ovo produz uma proteína exógena.

15 40. Produtos biológicos para uso em métodos terapêuticos e profiláticos, preparados usando um ovo conforme produzido pelos métodos de acordo com as reivindicações de qualquer das reivindicações precedentes.

20 41. Produto biológico, de acordo com a reivindicação 40, que é uma vacina, um anticorpo, um anticorpo monoclonal, um fibroblasto, uma proteína e/ou um antígeno para teste serológico ou outro produto de proteína similar.

42. Produto biológico, de acordo com a reivindicação 41, em que o produto é uma vacina, preferivelmente uma vacina para um vírus de gripe.

25 43. Método para a produção de ovos semi-estéreis para reabastecimento de bandos de pássaro, de acordo com o método de qualquer das reivindicações de 7 a 30, em que o pássaro mãe é obtido do bando de pássaros a ser reabastecido, o pássaro de postura produzido a partir do mesmo é testado para proporcionar uma medida de status livre de germe e uma vez
30 que tenha sido obtido o status livre de germe desejado o pássaro de postura e sua prole forma um bando de pássaros de status livre de germe apropriado.

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS APERFEIÇOADOS DE PRODUÇÃO DE OVOS DE AVES E PÁSSAROS DE STATUS LIVRE DE GERME ESPECIFICADO"**.

5 A presente invenção refere-se a um método aperfeiçoado de criação de um pássaro de status livre de germe especificado. Especificamente, a presente invenção está direcionada a um método para aumentar a capacidade de incubação e a viabilidade de ovos obtidos cirurgicamente de status livre de germe quando obtidos de um pássaro mãe. O método com-
10 preende alojar um pássaro como um pássaro mãe, determinando a posição de um ovo prematuro no trato reprodutivo e o estágio de desenvolvimento do ovo prematuro em termos de formação de casca e calcificação, remover cirurgicamente um ovo em sua casca de um pássaro mãe antes de transferir o
15 ovo para a cloaca no pássaro mãe, chocar o ovo e incubar o ovo para produzir um pássaro de postura. A invenção também está relacionada à produção de ovos de ave de status livre de germe especificado e usos do mesmo.