



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

(21) **PI0616255-0 A2**

(22) Data de Depósito: 20/09/2006
(43) Data da Publicação: 14/06/2011
(RPI 2110)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 5/00 2006.01

(54) Título: **MÉTODOS DE LOCALIZAR UM BLASTODERME DENTRO DE UM OVO DE AVE E DE DETERMINAR SE UM OVO DE AVE É FÉRTIL**

(30) Prioridade Unionista: 20/09/2005 US 60/718778

(73) Titular(es): EMBREX, INC.

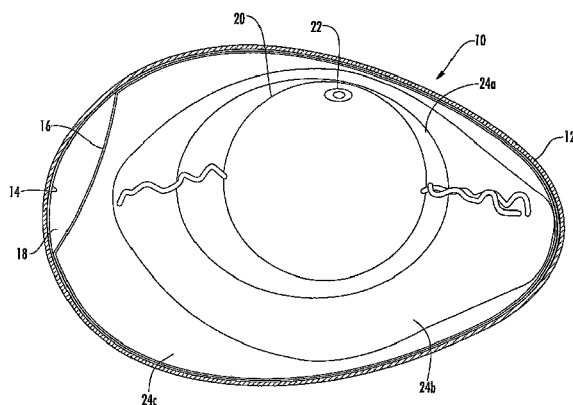
(72) Inventor(es): Dipak Mahato, Nandini Mendu, Phillip L. Rybarczyk Jr., Stephen P. Wolfe

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006036541 de 20/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/035768 de 29/03/2007

(57) Resumo: MÉTODOS DE LOCALIZAR UM BLASTODERME DENTRO DE UM OVO DE AVE E DE DETERMINAR SE UM OVO DE AVE É FÉRTIL. Métodos localizar não invasivamente blástodermes dentro de ovos de aves são providos. Uma abertura é formada na casca de um ovo em um local sob o qual um blástoderme é posicionado com base na orientação do ovo; uma imagem de uma membrana interna de casca exposta e material subjacente é obtido; a imagem obtida é processada para melhorar visibilidade de um blástoderme na imagem; e o blástoderme é localizado na imagem. Um material pode ser aplicado ao ovo para melhorar transparência do membrana interna de casca antes da obtenção da imagem. Localizar o blástoderme na imagem pode incluir determinar coordenadas de local do blástoderme na imagem. Estas coordenadas de local pode ser transmitidas para equipamento de processamento de ovo para subsequente processamento do ovo.



“MÉTODOS DE LOCALIZAR UM BLASTODERME DENTRO DE UM OVO DE AVE E DE DETERMINAR SE UM OVO DE AVE É FÉRTIL”

PEDIDO CORRELACIONADO

Este pedido reivindica o benefício de e prioridade do U. S.

5 Pedido de Patente Provisional No. 60/718.778, depositado em 20 de setembro de 2005, cuja exposição é aqui incorporada por referência como se exposta sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção refere-se geralmente a ovos e, mais particularmente, a métodos de processamento de ovos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Em incubadoras de aves domésticas e outros equipamentos de processamento de ovos, os ovos são manipulados e processados em grandes números. O termo "processamento" inclui, mas não é limitado a, tratar ovos
15 vivos com medicamentos, nutrientes, hormônios e/ou outras substâncias benéficas enquanto os embriões ainda estão no ovo (isto é, no ovo). Injeções no ovo de várias substâncias em ovos de aves foram empregada para diminuir a morbilidade pós-incubação e taxas de mortalidade, aumentar as taxas de crescimento em potencial ou eventual tamanho da ave resultante, e até mesmo
20 influenciar a determinação do sexo do embrião. Injeção de vacinas em ovos vivos foi efetivamente empregada para imunizar aves dentro do ovo.

Existe um número de aplicações para as quais é desejável injetar ovos contendo embriões primitivos de ave. Por exemplo, pode ser desejável fornecer uma substância a um embrião primitivo, tal como um
25 blastoderme. Para ilustrar, pode ser desejável na indústria processadora de aves domésticas manipular um embrião primitivo no ovo para introduzir uma molécula estranha de ácido nucleico (isto é, para criar uma ave transgênica) ou para introduzir uma célula(s) estranha(s) (isto é, para criar a ave quimérica) no embrião em desenvolvimento. Infelizmente, é freqüentemente

difícil localizar o blastoderme dentro de um ovo de ave e, mesmo se localizado, a visibilidade é tipicamente deficiente, particularmente através da membrana interna de casca de um ovo. Em adição, a cor e contraste de um blastoderme e material circundante de ovo são tipicamente similares, tornado assim ainda mais difícil de visualmente detectar o blastoderme. O blastoderme pode mais facilmente ser detectado se uma abertura é feita na membrana interna de casca (depois de uma abertura ter sido feita na casca). Todavia, a abertura ou rompimento da membrana interna de casca pode danificar o embrião em desenvolvimento e pode subsequenteemente conduzir à falha da incubação. Em adição, métodos adicionais de injetar material em blastodermes são freqüentemente não confiáveis por causa da dificuldade de localizar um blastoderme.

Por conseguinte, existe uma necessidade na arte por métodos aperfeiçoados de localizar e manipular o blastoderme dentro de ovos de aves e sem causar dano no ovo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em vista da discussão acima, métodos de localizar blastodermes dentro de ovos de aves são providos. De acordo com algumas formas de concretização da presente invenção, uma abertura é formada na casca de um ovo em um local sob o qual um blastoderme é posicionado com base na orientação do ovo e de modo que uma membrana interna de casca é exposta; uma imagem da membrana interna de casca exposta e de material subjacente é obtido; a imagem obtida é processada para melhorar visibilidade do blastoderme na imagem; e o blastoderme é localizado na imagem. Um material pode ser aplicado ao ovo para melhorar transparência da membrana interna de casca antes da obtenção da imagem. Localizar o blastoderme na imagem pode incluir determinar coordenadas de local do blastoderme na imagem. Estas coordenadas de local podem ser transmitidas para equipamento de processamento de ovo para subsequente processamento do ovo.

De acordo com algumas formas de concretização da presente invenção, subsequente processamento de ovo pode incluir estender um dispositivo através da abertura na casca de ovo e para dentro do blastoderme localizado. O dispositivo pode ser um dispositivo de fornecimento que libera uma substância no interior do blastoderme, e/ou um dispositivo de amostragem que remove material de amostra (por exemplo, células blastodermas, células adjacentes ao blastoderme, etc.) a partir do blastoderme, e/ou um dispositivo detector que detecta informação a partir de dentro do ovo.

De acordo com algumas formas de concretização da presente invenção, a abertura no ovo pode ser selada após obtenção da imagem ou depois de ulterior processamento (por exemplo, injeção de uma substância no ovo, remoção de material do ovo, detecção de informação a partir de dentro do ovo, etc.). O ovo selado pode então ser incubado até a eclosão.

De acordo com algumas formas de concretização da presente invenção, um método de determinar se um ovo de ave é fértil inclui formar uma abertura na porção da casca do ovo; obter uma imagem de uma membrana interna de casca exposta e material subjacente; processar a imagem obtida para determinar a presença de um blastoderme na imagem; e avaliar fertilidade do ovo de ave com base na presença ou ausência de um blastoderme.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 é uma vista em seção lateral de um ovo de ave convencional.

a figura 2 é um fluxograma ilustrando operações para localizar um blastoderme dentro de um ovo de ave, de acordo com algumas formas de concretização da presente invenção.

a figura 3A é um diagrama de blocos que ilustra uma câmera de vídeo digital elevada, configurada para obter imagens de um ovo com

janela, de acordo com algumas formas de concretização da presente invenção.

a figura 3B é uma imagem representativa de um blastoderme quando obtida pela câmera de vídeo da figura 3A.

5 a figura 3C ilustra a imagem representativa da figura 3B depois de processamento para aumentar contraste do blastoderme, de acordo com algumas formas de concretização da presente invenção.

a figura 3D ilustra a imagem representativa da figura 3C com um caixa de local colocada ao redor do blastoderme, de acordo com algumas formas de concretização da presente invenção.

10 as figuras 4A-4D são fotografias de ovo com janelas, em que as membranas de casca interna expostas nas figuras 4A e 4C são não tratadas e em que as membranas de casca interna expostas nas figuras 4B e 4D são tratadas com DMSO para aumentar a visibilidade do blastoderme.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

15 A presente invenção agora é descrita mais completamente aqui com referência aos desenhos acompanhantes, nos quais formas de concretização preferidas da invenção são mostradas. Esta invenção, todavia, pode ser incorporada em muitas formas diferentes e não deve ser entendida como limitada às formas de concretização aqui expostas; em contraste, estas
20 formas de concretização são providas de modo que sua exposição será minuciosa e completa, e irá totalmente transmitir o escopo da invenção para aqueles especializados na arte.

Os mesmos números se referem aos mesmos elementos por toda descrição. Nas figuras, a espessura de certas linhas, camadas,
25 componentes, elementos ou características pode ser exagerada, por clareza. Linhas tracejadas são usadas por clareza para indicar continuação, e podem ilustrar características ou operações opcionais, a menos que especificado ao contrário. Todas publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências mencionadas aqui, são incorporados aqui para referência em suas totalidades.

Será entendido que, quando um elemento é referido como estando "sobre" um outro elemento, ele pode estar diretamente sobre o outro elemento ou elementos intervenientes podem também estar presentes. Em contraste, quando um elemento é referido como estando "diretamente sobre" um outro elemento, não existem elementos intervenientes presentes. Será entendido que, quando um elemento é referido como estando "conectado" ou "fixado" com um outro elemento, ele pode estar diretamente conectado ou fixado com um outro elemento ou elementos intervenientes pode estar também presentes. In contraste, quando um elemento é referido como estando "diretamente conectado" ou "diretamente fixado" com um outro elemento, não existe elementos intervenientes presentes. O termos "para cima", "para baixo", "vertical", "horizontal" e similares são usados aqui apenas para a finalidade de explicação. Será também apreciado por aqueles de conhecimento na arte que referências a uma estrutura ou característica que é disposta "adjacente" a uma outra característica podem ter porções que sobrepõem ou se sobpõem à característica adjacente.

A menos que definido de outra maneira, todos termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado que comumente entendido por uma pessoa de conhecimento comum na arte à qual esta invenção pertence. A terminologia usada na descrição da presente invenção é somente para a finalidade de descrever formas de concretização particulares e não pretende ser limitativa da invenção. Quando usada na descrição da invenção e das reivindicações anexas, as formas singulares "um", "o" e "a" são destinadas a incluir também as formas plurais, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Quando usado aqui, o termo "e/ou" inclui quaisquer e todas combinações de um ou mais itens listados associados.

O termos "de ave" e "sujeitos aviários", quando usados aqui, são destinados a incluir machos e fêmeas de quaisquer espécies de aves, mas são principalmente destinados a englobar aves domésticas que são

comercialmente criadas para produção de ovos, carne ou como animais de estimação. Por conseguinte, o termos "de aves" e "sujeito aviário" são particularmente destinados a englobar várias aves, incluindo, mas não limitadas a, frangos, perús, patos, gansos, codornizes, faisões, periquitos, papagaios, cacatuas, cockatiel, avestruz, emu, etc.

Quando usado aqui, o termo "embrião primitivo" refere-se a um embrião de ave do instante de fecundação (estágio blastodermal) até aproximadamente o estágio de desenvolvimento onde células germinais primordiais (PGCs) estão em migração. Com particular respeito a embriões de frango, um "embrião primitivo" é geralmente aproximadamente um embrião no estágio embriônico 20 (H&H) ou mais anterior. O estágio de desenvolvimentos do embrião de frango é bem entendido na arte, ver, por exemplo, *The Atlas of Chick Development*, R. Bellairs & M. Osmond, eds., Academic Press, 1998.

Quando usado aqui, o termo "blastoderme" tem seu significado entendido na arte. Geralmente, um blastoderme inclui um embrião do instante de fecundação até o final da gastrulação. O blastoderme é algumas vezes referido na arte pelas designações alternativas de "disco germinal" ou "disco embriônico". Um blastoderme pode ser descrito como um disco chato de células que se formam durante clivagem no embrião primitivo e persiste até o final da gastrulação. No instante da fecundação, duas regiões principais do blastoderme são visíveis, a área pelúcida situada centralmente e a área opaca localizada perifericamente (*The Atlas of Chick Development*, R. Bellairs & M. Osmond, eds., Academic Press, 1998). Com particular respeito a embriões de frangos, o blastoderme é tipicamente caracterizado como um embrião do instante de fecundação (isto é, Estágio IX ou Estágio X EG&K) até aproximadamente o estágio XIII (EG&K) ou mais alto.

Quando usados aqui, os termos "injeção" e "injetar" englobam métodos de inserção de um dispositivo em um ovo ou embrião, incluindo

métodos de fornecer ou descarregar uma substância em um ovo ou embrião, métodos de remoção de uma substância (isto é, uma amostra) a partir de um ovo ou embrião, e/ou métodos de inserção de um dispositivo detector em um ovo ou embrião.

5 O termos "ave quimérica" ou "embrião quimérico" se refere a uma ave receptora ou embrião, respectivamente, que contém células de uma outra ave ou embrião, referido como um "doador". O termos "ave transgênica" e "embrião transgênico" são usados aqui de acordo com seus significados geralmente entendidos na arte. Uma ave transgênica ou embrião transgênico
10 contém uma seqüência estranha de ácido nucleico em uma ou mais células.

Quando usado aqui, o termo "membrana" se refere a qualquer camada de tecido dentro de um ovo. Membranas de exemplo dentro de um ovo incluem, mas não são limitadas a, a membrana externa de casca, membrana interna de casca, membrana corioalantóica, membrana vitelina, e
15 membrana amniótica (amniôn).

Com referência agora à figura 1, um ovo de ave 10 é ilustrado. O ovo 10 ilustrado inclui uma casca 12, uma membrana externa de casca 14, uma membrana interna de casca 16, e uma célula de ar 18 na extremidade plana do ovo 10 entre as membranas externa e interna de casca 14, 16. O ovo
20 10 ilustrado também inclui uma gema 20 e blastoderme 22 circundado pela delgada albúmen interna 24a, espessa albúmen externa 24b, e delgada albúmen externa 24c.

A figura 2 é um fluxograma que ilustra métodos de localizar o blastoderme dentro de ovos de aves, de acordo com algumas formas de concretização da presente invenção. Deve ser notado que as funções notadas
25 nos blocos pode ocorrer fora da ordem notada na figura 2. Dois (ou mais) blocos mostrados em sucessão podem, de fato, ser executados substancialmente ao mesmo tempo ou os blocos podem algumas vezes ser executados na ordem reversa ou diferente, dependendo da funcionalidade

envolvida.

Em adição, deve ser notado que formas de concretização da presente invenção podem ser utilizadas em vários estágios de desenvolvimento embrionário de um ovo de ave. Formas de concretização da presente invenção não são limitadas a o estágio de blastoderme de ovos de aves. Por exemplo, formas de concretização da presente invenção podem ser utilizadas em estágios após o blastoderme, tal como os dias 3-5 de incubação.

Inicialmente, uma porção da casca de ovo e uma porção da membrana externa de casca de um ovo são removidas para formar uma abertura ou janela que revela a membrana interna de casca (Bloco 100). Preferivelmente, a membrana interna de casca não é adversamente afetada pela formação de uma janela na casca de ovo e permanece essencialmente intacta. A janela pode ser formada em várias maneiras incluindo, por exemplo, através de um punção, uma broca ou através de outros dispositivos conhecidos por aqueles com conhecimento na arte.

Em adição, a janela pode ser feita em qualquer local apropriado de um ovo, por exemplo, no lado de um ovo próximo ao eixo equatorial, em qualquer extremidade de um ovo, etc. Em algumas formas de concretização da invenção, a abertura na casca de ovo é introduzida em uma porção voltada para cima da casca de um ovo posicionado geralmente horizontalmente e sobre a célula de ar. Aqueles com conhecimento na arte apreciarão que embrião primitivo (por exemplo, blastoderme) se localizará tipicamente propriamente em uma área em ou próximo da porção mais superior de um ovo. Assim, a abertura na casca de ovo será geralmente feita na porção mais superior de um ovo próximo onde é esperado que o embrião primitivo (por exemplo, blastoderme) é se localize, a menos que medidas sejam tomadas para direcionar o embrião para uma diferente posição dentro de um ovo.

De acordo com algumas formas de concretização da presente

invenção, a superfície de um ovo, pelo menos ao redor do local de formação da janela, pode ser desinfetada para reduzir contaminação por micróbios (ou outra) (por exemplo, com um álcool ou outra solução de desinfecção). Todavia, a desinfecção de um ovo, incluindo o local da janela, não é requerida com respeito às formas de concretização da presente invenção.

De acordo com algumas formas de concretização da presente invenção, a transparência da membrana interna de casca pode ser aumentada, por exemplo, por meio da aplicação de materiais tais como sulfóxido de dimetila (DMSO) ou glicerina na membrana interna de casca (Bloco 200).

Outros materiais que podem melhorar a transparência da membrana interna de casca ou que podem de outra maneira ajudar na formação de imagem podem também ser utilizados, incluindo, mas não limitados a, água, álcool, sistema tampão fosfatado (PBS), óleo de canola, óleo vegetal, óleo mineral, triacetina, acetona, etileno glicol, éter monometílico, etc.

Uma ou mais imagens digitais são então tomadas da membrana interna da casca exposta e material subjacente (incluindo o blastoderme) (Bloco 300). Imagens digitais de quadro único podem ser obtidas através de uma câmera digital e/ou imagens de vídeo digitais podem ser obtidas através de câmera de vídeo digital, de acordo com algumas formas de concretização da presente invenção. Formas de concretização da presente invenção não são limitadas à formação de imagens digitais, todavia. Imagens não digitais da membrana interna de casca exposta e material subjacente podem ser obtidas e então convertidas para o formato digital para subsequente processamento de imagem, como descrito abaixo.

Outras tecnologias e técnicas de formação de imagens podem ser utilizadas na obtenção de um blastoderme de acordo com formas de concretização da presente invenção. Por exemplo, Ultra-som de Alta Resolução e Tomografia de Coerência Óptica (OCT) podem ser utilizadas. Por exemplo, uma pequena amostra de OCT pode ser posicionada na ponta de

uma agulha ou outro dispositivo configurado para ser inserido no ovo. A OCT poderia produzir uma imagem tridimensional do blastoderme e cavidade subgerminal subjacente por fazer uma série de vários varrimentos superiores e observando uma de uma região cheia com fluido. A agulha pode então ser inserida em um ovo (por exemplo, sob uma essencialmente intacta membrana interna de casca).

A(s) imagem(s) digital(is) obtida(s) pode(m) então ser sujeita(s) a uma ou mais técnicas de processamento de imagens para melhorar a visibilidade do blastoderme na imagem (Bloco 400). Todavia, o processamento de imagem não é requerido de acordo com formas de concretização da presente invenção. A visibilidade de um blastoderme pode ser suficiente em uma imagem não processada. O blastoderme é então localizado usando software de "visão de máquina" (Bloco 500). As coordenadas de local do blastoderme dentro da imagem digital são então enviadas ao equipamento de processo que inserirá um dispositivo através da janela de membrana interna de casca e no interior do blastoderme e/ou área adjacente ao blastoderme (Bloco 600). O dispositivo pode injetar material, e/ou pode retirar material de amostra, e/ou pode detectar informação a partir de dentro do ovo. Se o dispositivo inserido no ovo é um dispositivo de fornecimento, uma ou mais substâncias podem ser liberadas através do dispositivo de fornecimento e depositadas no interior do blastoderme e/ou em estreita proximidade do mesmo. Uma ou mais substâncias podem também ser depositadas em outros locais dentro do ovo. Formas de concretização da presente invenção não são limitadas à deposição de uma ou mais substâncias em ou próximo o blastoderme.

Se o dispositivo inserido no ovo é um dispositivo de amostragem, uma ou mais amostras (por exemplo, células blastodermas, etc.) podem ser removidas do blastoderme e/ou da estreita proximidade do mesmo. Uma ou mais amostras podem ser tomadas das porções extra-embriônicas do

ovo (por exemplo, a gema ou o albúmen). Por exemplo, uma amostra pode ser tomada do albúmen para determinar a presença ou ausência de contaminação por micróbios (por exemplo, Salmonela) da mesma, etc.

5 O dispositivo de amostragem pode ser uma agulha configurada para puxar material (por exemplo, fluido alantóico, outro fluido, etc.) a partir do ovo, como seria entendido por aqueles com conhecimento na arte. Por exemplo, a agulha pode ter uma ponta plana e um lúmen que se estende axialmente, o qual termina em uma abertura formada dentro da porção da agulha adjacente à agulha. Material pode ser puxado de dentro do lúmen
10 através da abertura quando da sujeição do lume ao vácuo. A ponta plana previne que o lúmen se torne entupido com material.

Tipicamente, uma amostra é removida do ovo para obter informação do mesmo. A amostra pode ser removida, por exemplo, em conexão com métodos de determinação de sexo ou determinação da
15 viabilidade de um embrião. Para ilustrar, uma amostra contendo células pode ser removida do embrião, e as células podem ser analisadas (tipicamente depois da remoção a partir do ovo) para detectar os cromossomas sexuais ou seqüências específicas de sexo nos cromossomos, como é conhecido por aqueles com conhecimento na arte. A amostra pode também ser usada para
20 qualquer outro ensaio baseado em ADN, por exemplo, para determinar a presença de um particular gene ou alelo de interesse no embrião.

Em algumas formas de concretização, um dispositivo de múltiplos locais ou de amostragem pode ser usado, por exemplo, como descrito na Patente US No. 6.032.612. outros dispositivos de exemplo de
25 fornecimento e/ou amostragem incluem aqueles descritos na Patente US No. 5.136.979; U.S. Patentes Nos. 4.681.063 e 4,903,635; e Patentes US Nos. 4.040.388, 4.469.047 e 4.593.646.

Se o dispositivo inserido no ovo é um detector, vários tipos de informação do interior do ovo podem ser detectados. O detector pode ser

inserido em um local extra-embriônico do ovo (por exemplo, a gema ou a célula de ar). Alternativamente, o detector pode ser colocado em estreita proximidade (como definido acima) do embrião. Em outras formas de concretização, o detector pode ser colocado dentro da área translúcida ou da área opaca do embrião ou dentro da cavidade subgerminal. O dispositivo detector pode ser usado para coletar informação incluindo, mas não limitada ao, o tamanho do embrião, o local do embrião, o estágio de desenvolvimento do embrião e/ou quaisquer características do embrião, o sexo do embrião, e/ou a viabilidade do embrião. O dispositivo detector pode obter informação com respeito ao local do embrião e à cavidade subgerminal.

A informação pode ser capturada por meio de um instrumento (por exemplo, um computador ou outro processador de dados) que é conectado com o detector. Vários tipos de detectores podem ser utilizados, incluindo, mas não limitados a, sensores elétricos, sensores ópticos, sensores químicos, sensores de temperatura, sensores acústicos, sensores de pressão, ou qualquer outro dispositivo para detectar um parâmetro físico ou químico. Detectores de exemplo são descritos, por exemplo, na Patente US No. 6.244.214 de Hebrank.

Após a injeção de uma substância e/ou remoção de uma amostra e/ou detecção de informação a partir do ovo, o dispositivo é retraído a partir do ovo. A pequena abertura na casca de ovo pode ser selada com um selante e o ovo pode ser incubado até a eclosão.

Aqueles com conhecimento na arte apreciarão que os métodos da presente invenção podem ser executados em uma pluralidade de ovos, por exemplo, em uma operação comercial de produção de aves domésticas. Além disto, os métodos descritos aqui podem ser completamente manuais, totalmente automáticos, ou semi-automáticos.

Um sistema de formação de imagens, de acordo com algumas formas de concretização da presente invenção, inclui componentes de

hardware e software. Os componentes de hardware incluem uma fonte de luz (por exemplo, fonte de luz de halogênio de 150 Watts, etc.), uma câmera de vídeo digital e lentes de focalização apropriadas, e um computador ou outro processador de dados conectado com a câmera através de, por exemplo, um
5 cartão de vídeo (por exemplo, um cartão IEEE 1394 ("firewire")). De acordo com a particular forma de concretização, uma câmera tendo resolução de 12-bits ou mais elevada, com alta faixa dinâmica, é utilizada. Uma câmera de exemplo é uma monochrome Basler A601 HDR com alta faixa dinâmica (até 112dB) com 16-bit resolução e tecnologia de sensor CMOS de exploração
10 progressiva. várias câmeras podem ser utilizadas. Formas de concretização da presente invenção não são limitadas a uma câmera, lente, e/ou tecnologia de captura e armazenagem de imagem particulares (por exemplo, CCD ou CMOS). Formas de concretização da presente invenção não são limitadas a um tipo particular de fonte de luz, ou a uma particular voltagem de fonte de
15 luz, ou a um particular local e/ou orientação de uma fonte de luz.

De acordo com algumas formas de concretização da presente invenção, componentes adicionais que podem ser utilizados incluem componentes ópticos, tais como filtros de luz e/ou fontes de luz (incluindo aqueles comercialmente disponíveis de fontes tais como Edmund Optics,
20 Omega Optics, etc.) que ajudam no contraste do blastoderme (branco) com relação às suas circunvizinhanças (amarelas). Por exemplo, as depositantes verificaram que um blastoderme se torna muito mais visíveis se luz azul for usada para a iluminação do mesmo. Luz azul pode ser produzida por meio de uma fonte de luz azul ou por meio de uma fonte de luz branca filtrada com um
25 meio de filtragem de azul (por exemplo, lente, etc.). Esta melhoria em visibilidade ajuda o componente de software, o qual contém o algoritmo de obtenção e processamento de imagem que pesquisa o blastoderme em cada imagem obtida.

O processamento de imagem, de acordo com algumas formas

de concretização da presente invenção, é utilizado para localizar um blastoderme em uma imagem, e, opcionalmente, para melhorar o contraste do blastoderme na imagem. O processamento de imagem para localizar um blastoderme inclui algoritmos, tais como de adequação de padrões e análise de Blob (“Binary Large Object”). O processamento de imagem para melhorar o contraste de um blastoderme em uma imagem inclui extrações de plano de RGB (vermelho-verde-azul) e vários outros algoritmos de filtragem (por exemplo, alisamento, detecção de borda, Gaussiano, etc.). Técnicas de processamento de imagem de exemplo que podem ser utilizadas de acordo com formas de concretização da presente invenção são descritas na Patente US Nos.: 6.219.452; 6.222.940; 6.229.921; 6.256.625; 6.370.270; 6.366.686; 6.493.079; e 6.535.640.

Por exemplo, na adequação de padrões, um usuário seleciona uma imagem de gabarito para o software para encontrar em imagens subseqüentes, e então ajusta outros parâmetros, tais como o número de coincidências, para encontrar a profundidade de busca (fina até grosseira), limitações de classificação, e padrões girados. A adequação de padrões, análise de Blob (“Binary Large Object”), extração de plano de RGB (vermelho-verde-azul) e outras técnicas de processamento de imagem são bem conhecidas por aqueles com conhecimento na arte e não precisam ser descritas mais detalhadamente aqui.

Software de formação de imagens, de exemplo, que pode ser usado de acordo com formas de concretização da presente invenção, inclui “Vision Builder for Automated Inspection”, disponível de National Instruments, Inc. Este software se integra bem com o software LabVIEW, também disponível de National Instruments, Inc. e que é utilizado com outros procedimentos de processamento de ovos, incluindo detecção de pressão e injeção.

Com referência à figura 3A, uma câmera de vídeo superior 30

é configurada para obter imagens de um ovo com janela 10 (isto é, um ovo com uma abertura formada na casca, como descrito acima) mantido no local através de uma fixação ou berço 32. Ovos podem ser mantidos no local através de vários tipos de dispositivos, sem limitação. Além disto, múltiplos

5 ovos podem ser processados conjuntamente, de acordo com algumas formas de concretização da presente invenção. Por exemplo, uma bandeja de ovos pode funcionar como um berço 32 para uma pluralidade de ovos.

Uma imagem representativa de um blastoderme 22, como obtida pela câmera de vídeo 30 é mostrada na figura 3B. O blastoderme

10 ilustrado 22 é apenas distinguível da gema circundante 20.

Formas de concretização da presente invenção não são limitadas à orientação ilustrada da fonte de luz. De acordo com outras formas de concretização da presente invenção, um iluminador difuso axial (disponível, por exemplo, de Advanced Illumination, Inc.) pode ser

15 posicionado entre a câmera e o ovo. O iluminador difuso axial tem espelhos dicróicos angulados circundados com LEDs (azuis) para orientar a luz apropriadamente para o blastoderme e então de volta para a câmara 30.

Com referência à figura 3C, o processamento da imagem da figura 3B através de software de processamento de imagem produz uma

20 imagem onde o blastoderme 22 a imagem aumentada em seu contraste em relação à gema 20. Na figura 3D, o software detecta o blastoderme 22 e coloca uma caixa 40 ao redor de o blastoderme 22 na imagem. As coordenadas desta caixa (por exemplo, o ponto central geométrico) podem ser providas para um dispositivo para ser inseridas em e/ou adjacentes ao

25 blastoderme 22, como descrito acima.

De acordo com algumas formas de concretização da presente invenção, um sistema de formação de imagens como descrito acima pode ser adaptado para manipular múltiplos ovos de uma vez, e pode incluir múltiplas câmeras. Além disto, ovos em virtualmente qualquer orientação, incluindo

horizontal, vertical, inclinada, etc., podem ser processados de acordo com algumas formas de concretização da presente invenção.

5 Algumas formas de concretização da presente invenção são particularmente adaptadas para precisamente e rapidamente localizar o blastoderme em ovos de 0 dia férteis, não incubados. Algumas formas de concretização da presente invenção podem também ser utilizadas em formação de imagens de embriões durante a incubação, por exemplo, durante os dias 0 - 5.

10 Algumas formas de concretização da presente invenção não são limitadas a localizar o blastoderme dentro de ovos de aves. O crescimento de embrião pode ser monitorado por meio de algumas formas de concretização da presente invenção. De acordo com algumas formas de concretização da presente invenção, o local de vasos sanguíneos específicos pode ser determinado para facilitar o fornecimento de uma proteína ou vetor
15 para o sistema circulatório. De acordo com algumas formas de concretização da presente invenção, técnicas de formação de imagens podem ser utilizadas para determinar se um ovo está fértil ou infértil. De acordo com algumas formas de concretização da presente invenção, técnicas de formação de imagens podem ser utilizadas em conjunção com técnicas de orientação e
20 posicionamento de embrião. Técnicas de orientação e posicionamento de embrião são descritas no Pedido de Patente US Serial No. 10/216.427, o qual é comumente cedido para a cessionária do presente pedido.

Um blastodisco (tipicamente apenas uma ou duas células) é a região na superfície de uma gema de ovo onde a formação do embrião ocorre,
25 independentemente de se ou não o ovo foi fertilizado. Uma vez quando ele é fertilizado, o blastodisco eventualmente se tornará o blastoderme (isto é, o blastodisco se multiplicará de uma ou duas células para dezenas de milhares de células). Assim, um ovo não fértil não terá um blastoderme.

De acordo com algumas formas de concretização da presente

invenção, um método de determinar se um ovo de ave é fértil, inclui formar uma abertura na porção da casca do ovo, e obter uma imagem de uma membrana de casca interna exposta e material subjacente. A imagem obtida é processada para determinar a presença de um blastoderme na imagem. A fertilidade do ovo é baseada na detecção da presença ou ausência de um blastoderme na imagem. Se um blastoderme não for detectado ou se uma forma na imagem não coincidir com as características de um blastoderme (por exemplo, forma, tamanho, etc.), o ovo é considerado não fértil.

Exemplo 1

Um impedimento principal em injetar um blastoderme através da membrana interna de casca é que é frequentemente difícil observar o blastoderme através da membrana porque a membrana, embora um pouco translúcida, tipicamente não é transparente. Para contornar esta dificuldade, tentamos tornar a membrana mais transparente por revesti-la com várias substâncias líquidas. Ovos foram armazenados de acordo com a prática da indústria (75% de umidade relativa, 16°C, 8 dias) antes da manipulação. A casca e membrana externa de casca foram removidas no local da célula de ar, expondo a membrana interna intacta da casca. A membrana interna de casca foi revestida com um de 4 líquidos diferentes (água, óleo mineral, glicerina, ou DMSO) usando uma mecha de algodão.

O uso de água e óleo mineral não teve virtualmente nenhum efeito sobre a claridade da membrana interna de casca. Glicerina e DMSO, ambos, tiveram o efeito de 'clarear' a membrana interna de casca. Embora ela não tenha sido tornada transparente a clareza foi definitivamente melhorada. Em casos onde o blastoderme foi um pouco visível, a adição de ou DMSO melhorou a visibilidade do blastoderme e a percepção de profundidade. Em alguns casos onde o blastoderme não era de modo algum visível, a adição de glicerina ou DMSO usualmente permitiu a visualização do blastoderme, e melhorou a capacidade de distinguir ovos inférteis (ver as figuras 4A-4D).

As figuras 4A-4D ilustram a visibilidade aumentada do blastoderme dentro de ovos usando DMSO. As figuras 4A e 4C ilustram ovos não tratados e as figuras 4B e 4D ilustram os mesmos ovos tamponados com DMSO. Os blastodermes nas figuras 4B e 4D são ilustrados por meio da seta A. Note que, embora o blastoderme na figura 4A pareça como um borrão lanoso, o tratamento com DMSO grandemente melhorou a nitidez do blastoderme na imagem. Na figura 4C, onde o blastoderme não é sobretudo visível, a adição de DMSO tornou o blastoderme claramente visível na imagem, como mostrado na figura 4D.

Pareceu que o DMSO fornece uma visibilidade ligeiramente melhor que glicerina. Glicerina apresentou a tendência de ser difícil de se trabalhar (pegajosa e deixou um globo sobre a membrana interna de casca). O DMSO rapidamente se evaporou ou difundiu através da membrana, e não deixou traço. O tratamento da membrana interna de casca com DMSO pode ser uma técnica muito útil para ajudar na visualização do blastoderme para injeção manual.

Exemplo 2

Para avaliar a toxicidade de DMSO no desenvolvimento embriônico, embriões foram tratados com DMSO, como descrito no Exemplo 1 e colocados para chocar, e então comparados com embriões com nenhum tratamento com DMSO. Para avaliar mais detalhadamente os efeitos de DMSO sobre o clareamento da membrana interna de casca, foram usados ovos que foram armazenados por somente 4 dias. Três grupos de tratamento foram usados:

A) Janela+DMSO: Ovos com janela na extremidade plana, sem dano da membrana interna de casca. A membrana interna de casca foi tamponada com DMSO. Somente ovos com um visível blastoderme foram mantidos neste grupo de tratamento. O blastoderme foi perfurado com uma micropipeta de Humagen, cheio com meio de KRB, para similar injeção. Os

ovos foram selados com silicone + fita. N=42 (isto é, 42 ovos estavam neste grupo).

5 B) Janela + nenhum DMSO: Ovos foram providos com janelas na extremidade plana, sem dano da membrana interna de casca. Os ovos foram selados com silicone + fita. N=39 (isto é, 39 ovos estavam neste grupo).

C) Não manipulados: Ovos foram totalmente não manipulados e colocados para chocar. N=54 (isto é, 54 ovos estavam neste grupo).

Resultados de Incubação:

Grupo de tratamento	A 42	B 39	C 54
(A) Embriões mortos antes da injeção, transferência, ou de ponta cabeça, ou mal formados.			
Inférteis		1	3
Prematuramente mortos	8	2	2
Medianamente mortos	2	2	
Rotação	2		
Casca quebrada			
Mal formados			
De ponta cabeça			
TOTAL A	12	5	5
(A) Embriões que morreram após a injeção, transferência, ou vivos que não eclodiram			
Mortos tardiamente	3		
Pintos vivos	1	2	1
Pintos não vivos			
Postos de lado			
Mortos			
Má posição	2	3	1
TOTAL B	6	5	2
(C) Normais incubados			
TOTAL C	24 (57%)	29 (74%)	47 (87%)

10 Deve ser notado que existiram ovos podres na incubadora (de um outro estudo), que deixaram vazar bactérias sobre o grupo de tratamento A, provavelmente resultando na classificação 'podres', e os pintos tardiamente mortos.

15 Existiu uma redução na chocagem dentre aqueles ovos tratados com DMSO em comparação com ovos que foram exatamente providos com janela e selados. Parte desta redução pode ser causada por contaminação por

bactérias a partir dos ovos na incubadora. Existem mais ovos precocemente mortos no grupo A que no grupo B ou C. Uma vez que existe menos ou não existem ovos inférteis no grupo A, é provável que este aumento de mortes precoces é devido à toxicidade de DMSO. O pequeno risco de toxicidade de DMSO pode ser ponderado por visibilidade e injetabilidade aumentadas do blastoderme.

O precedente é ilustrativo da presente invenção e não deve ser entendido como limitação da mesma. Embora poucas formas de concretização de exemplo desta invenção tenham sido descritas, aqueles com conhecimento na arte apreciarão facilmente que muitas modificações são possíveis nas formas de concretização de exemplo sem fugir dos ensinamentos novos e vantagens desta invenção. Por conseguinte, todas de tais modificações são destinadas a serem incluídas dentro do escopo desta invenção como definida nas reivindicações. A invenção é definida pelas seguintes reivindicações, com equivalentes das reivindicações a serem aqui incluídos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de localizar um blastoderme dentro de um ovo de ave, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 formar uma abertura na casca de um ovo em um local sob o qual um blastoderme é posicionado e de modo que uma membrana interna de casca é exposta;

obter uma imagem digital da membrana interna de casca exposta e material subjacente;

10 processar a imagem digital obtida para melhorar visibilidade de um blastoderme na imagem digital; e

localizar o blastoderme na imagem digital via um software de visão de máquina.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ainda compreende aplicar um material ao ovo na membrana
15 interna de casca para melhorar sua transparência antes da obtenção da imagem.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que localizar o blastoderme na imagem compreende determinar coordenadas de local do blastoderme na imagem, e ainda compreendendo
20 transmitir as coordenadas de local do blastoderme para o equipamento de processamento de ovo.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que ainda compreende estender um dispositivo através da abertura na casca de ovo e no interior do blastoderme em resposta a receber as
25 coordenadas de local.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o dispositivo é um dispositivo de fornecimento que libera uma substância no interior do blastoderme.

6. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo

fato de que o dispositivo é um dispositivo de amostragem que remove material de amostra a partir do blastoderme.

5 7. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o dispositivo é um dispositivo detector que detecta informação a partir de dentro do ovo.

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o ovo é selecionado do grupo consistindo de ovos de frango, peru, pato, ganso, codorniz, faisão, periquito, papagaio, caturva, cockatiel, avestruz e emu.

10 9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ainda compreende selar a pequena abertura na casca de ovo após obtenção da imagem.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que ainda compreende incubar o ovo até a eclosão.

15 11. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o dispositivo é um dispositivo de fornecimento de múltiplas injeções.

20 12. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o material de amostra removido do ovo compreende células blastodermas.

13. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o dispositivo detector é selecionado do grupo consistindo de sensores elétricos, sensores ópticos, sensores químicos, sensores de temperatura, sensores acústicos, e sensores de pressão.

25 14. Método de localizar um blastoderme dentro de um ovo de ave, caracterizado pelo fato de que compreende:

formar uma abertura na casca de um ovo em um local sob o qual um blastoderme é posicionado e de modo que uma membrana interna de casca é exposta;

aplicar um material na membrana interna de casca para melhorar sua transparência;

obter uma imagem digital da membrana interna de casca exposta e material subjacente;

5 processar a imagem digital obtida para melhorar visibilidade de um blastoderme na imagem digital;

determinar coordenadas de local do blastoderme na imagem digital via software de visão de máquina; e

10 transmitir as coordenadas de local para o equipamento de processamento de ovo.

15 15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que ainda compreende estender um dispositivo através da abertura na casca de ovo e no interior do blastoderme em resposta a receber as coordenadas de local.

15 16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o dispositivo é um dispositivo de fornecimento que libera uma substância no interior do blastoderme.

20 17. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o dispositivo é um dispositivo de amostragem que remove material de amostra a partir do blastoderme.

18. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o dispositivo é um dispositivo detector que detecta informação a partir de dentro do ovo.

25 19. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que ainda compreende selar a pequena abertura na casca de ovo após obtenção da imagem.

20. Método de determinar se um ovo de ave é fértil, caracterizado pelo fato de que compreende:

formar uma abertura na casca de um ovo em um local sob o

qual um blastoderme está provavelmente posicionado e de modo que uma membrana interna de casca é exposta;

obter uma imagem digital da membrana interna de casca exposta e material subjacente;

5 processar a imagem digital obtida para determinar se um blastoderme está presente na imagem digital; e

avaliar fertilidade do ovo de ave com base na presença ou ausência de um blastoderme na imagem.

21. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
10 pelo fato de que ainda compreende iluminar a membrana interna de casca exposta e subjazer material para luz azul durante a etapa de obter imagem digital.

22. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado
15 pelo fato de que ainda compreende iluminar a membrana interna de casca exposta e subjazer material para luz azul durante a etapa de obter imagem digital.

23. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado
pelo fato de que ainda compreende iluminar a membrana interna de casca exposta e subjazer material para luz azul durante a etapa de obter imagem
20 digital.

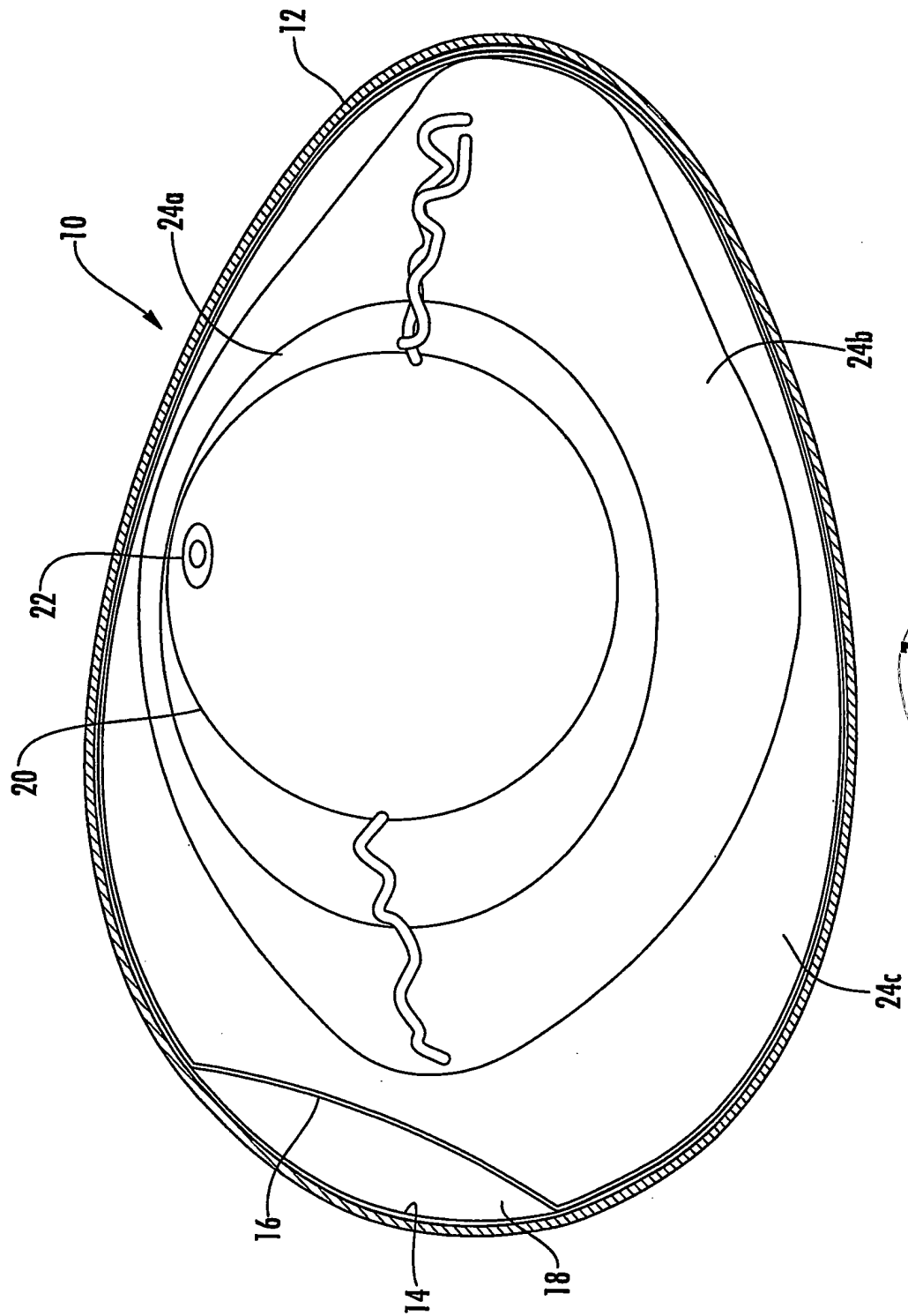


FIG. 1

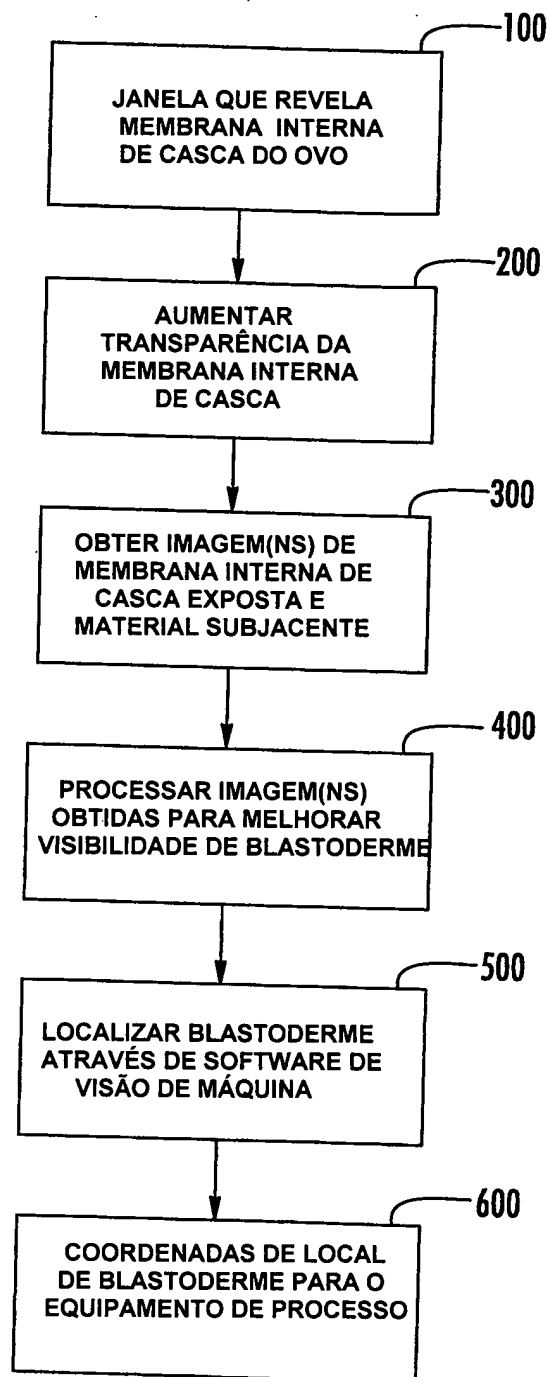


FIG. 2

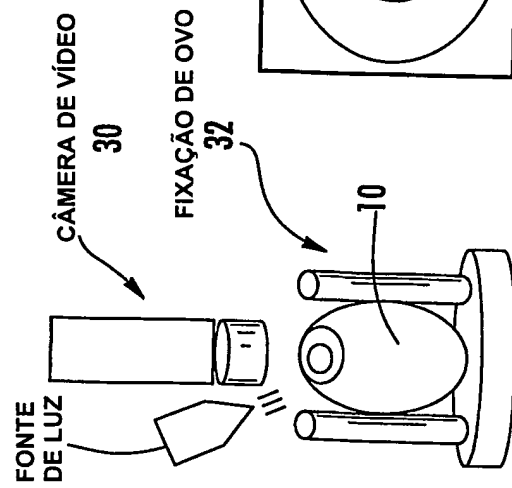


FIG. 3A

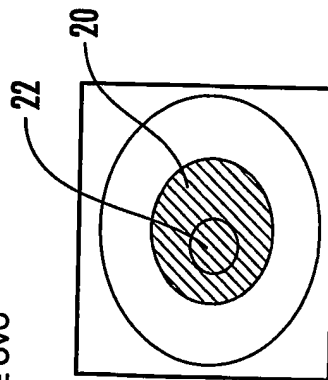


FIG. 3B

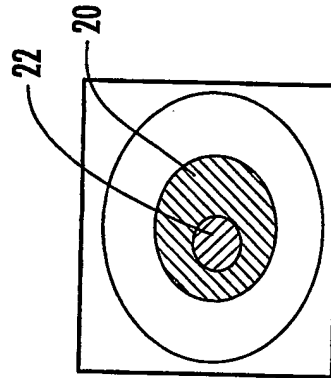


FIG. 3C

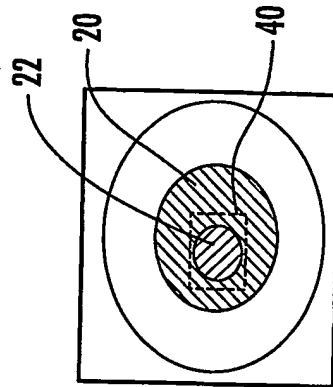


FIG. 3D

FIG. 4A

FIG. 4B

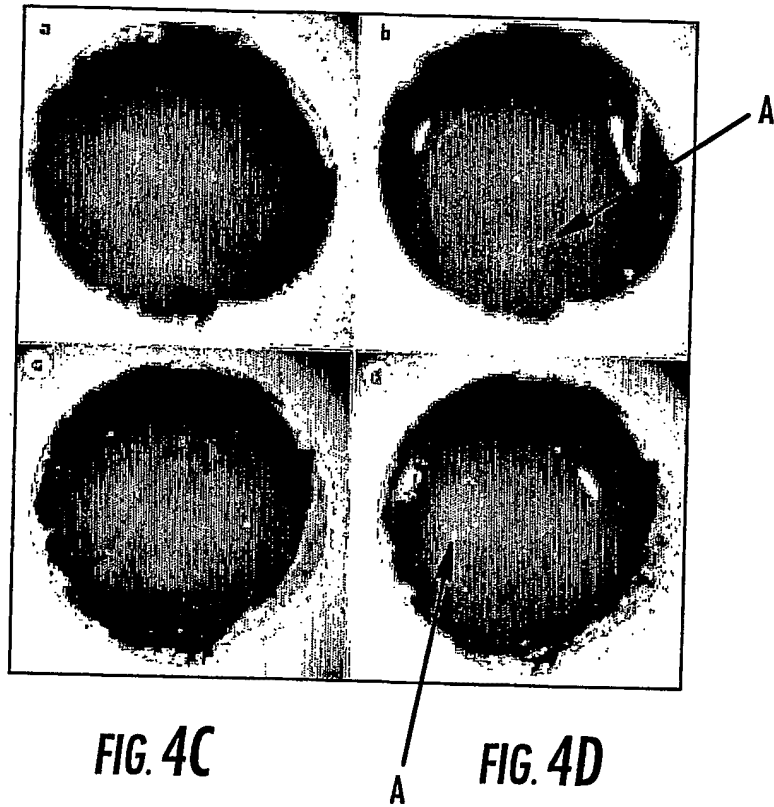


FIG. 4C

FIG. 4D

RESUMO

“MÉTODOS DE LOCALIZAR UM BLASTODERME DENTRO DE UM OVO DE AVE E DE DETERMINAR SE UM OVO DE AVE É FÉRTIL”

5 Métodos localizar não invasivamente blastodermes dentro de ovos de aves são providos. Uma abertura é formada na casca de um ovo em um local sob o qual um blastoderme é posicionado com base na orientação do ovo; uma imagem de uma membrana interna de casca exposta e material subjacente é obtido; a imagem obtida é processada para melhorar visibilidade de um blastoderme na imagem; e o blastoderme é localizado na imagem. Um

10 material pode ser aplicado ao ovo para melhorar transparência do membrana interna de casca antes da obtenção da imagem. Localizar o blastoderme na imagem pode incluir determinar coordenadas de local do blastoderme na imagem. Estas coordenadas de local pode ser transmitidas para equipamento de processamento de ovo para subsequente processamento do ovo.