

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 247**

51 Int. Cl.:

**A01K 45/00** (2006.01)

**G01N 33/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2014 PCT/US2014/061119**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15058076**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2014 E 14808744 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3057414**

54 Título: **Direccionamiento selectivo a estructura embrionaria y dispositivo de administración de la sustancia**

30 Prioridad:  
**17.10.2013 US 201361891915 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.11.2023**

73 Titular/es:  
**BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA INC. (50.0%)**  
**3239 Satellite Boulevard, Bldg. 500**  
**Duluth, GA 30096, US y**  
**AGRI ADVANCED TECHNOLOGIES GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:  
**MEISSNER, SVEN;**  
**GEISSLER, STEFAN;**  
**FROHNERT, TONI;**  
**GOEHLER, DOREEN y**  
**FISCHER, BJOERN**

74 Agente/Representante:  
**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

ES 2 954 247 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Direccionamiento selectivo a estructura embrionaria y dispositivo de administración de la sustancia

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a un dispositivo de administración de sustancias a estructuras embrionarias específicas, que incluyen corazón y vasos sanguíneos, en un huevo aviar en desarrollo.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0002] Los dispositivos y las técnicas de ovoscopia e inyección *in ovo* se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se conocen dispositivos de inyección que inyectan sustancias de tratamiento, tales como vacunas, antibióticos o vitaminas, directamente en huevos para limitar la tasa de mortalidad o aumentar el crecimiento del embrión. Tales dispositivos comprenden de manera convencional una cabeza de inyección que comprende una pluralidad de inyectores móviles de forma vertical por encima de una cinta transportadora dirigida con huevos a ser tratados, estando los huevos colocados de manera convencional en celdas de bandejas de incubación. Sin embargo, antes de la presente divulgación, ningún grupo ha divulgado la administración automatizada de sustancias a estructuras o regiones específicas de un embrión aviar en desarrollo.

20 *Referencia/Bibliografía/Revisión de Patentes*

[0003] El documento FR 2 873 894 (de Breuil) propone una cabeza de inyección en donde cada inyector está equipado con su propio sistema de movimiento para mover el inyector desde una posición elevada a una posición de inyección en la que su aguja puede inyectar una sustancia en el huevo.

[0004] El documento US 8.336.491 (de Ceva Sante Animate) propone una solución alternativa para la inyección selectiva de huevos fertilizados y vivos y, de manera particular, para inyectar una sustancia solamente en las celdas que contienen un huevo. Aunque este enfoque es más selectivo que el que se enseña en la técnica anterior de Breuil, Ceva no logra divulgar o sugerir ningún procedimiento de administración de sustancias a partes específicas del embrión aviar en desarrollo.

[0005] El documento WO 2012016870 (de Ceva Sante Animate) da a conocer un procedimiento de posicionamiento de la punta de una aguja de inyección o muestreo, en un huevo aviar, comparando los parámetros eléctricos medidos y de referencia. La aguja se mueve hasta que los parámetros medidos son característicos de una zona de inyección y/o muestreo deseada. En cambio, la presente divulgación proporciona dispositivos y procedimientos de adquisición y almacenamiento de información visual y, posteriormente, direccionamiento a localizaciones estructurales en un embrión aviar en desarrollo.

[0006] El documento WO 2007126816 (de Embrex) enseña la inyección directa en el cuerpo de embrión aviar, durante el último trimestre de incubación, de una dosis inmunizante eficaz de una composición inmunogénica. La solicitud indica que los tejidos musculares de ejemplo se encuentran cerca de la cáscara de huevo, y, por consiguiente, se alcanzan de forma relativamente fácil mediante el aparato de inyección sin dañar las otras estructuras embrionarias. Por consiguiente, a diferencia de la presente divulgación, la solicitud de Embrex alerta expresamente que la penetración de estructuras embrionarias (aparte del músculo esquelético de embrión del cuarto trimestre) resulta ser nociva para el embrión en desarrollo.

[0007] El documento US 6.244.214 (de Embrex) enseña un aparato de «sonda inteligente» para la identificación de una estructura o compartimento específico en un huevo que se encuentra en contacto con una aguja que ha penetrado la cáscara del huevo, y los procedimientos del uso del aparato para la administración de composiciones en estructuras y/o compartimentos específicos en un huevo. A diferencia de la presente divulgación, que determina la información de posicionamiento en parte mediante el uso no invasivo de luz transmitida, la patente de Embrex enseña un detector para determinar la información de posicionamiento, en la que el detector entra en el huevo a través de una abertura previamente creada en el mismo.

[0008] El documento EP 2319653 A1 (de Laservorm GmbH) enseña que las cáscaras de huevo se pueden cortar con rayos láser dirigidos, pero no enseña ni sugiere un sistema automatizado de inyección de sustancias en estructuras embrionarias aviares específicas.

[0009] Jochemsen y Jeurissen (2002) enseñan la inyección de huevos aviares a partir del Día 16 después de la fecundación, pero no la inyección de estructuras embrionarias específicas, y, desde luego, ninguna inyección antes de 120 horas después de fecundación.

[0010] El documento WO2007035768 se refiere a procedimientos de localización no invasiva de blastodermos en huevos aviares.

**[0011]** El documento WO2011128717 se refiere al campo de posicionamiento de un dispositivo en un huevo de un ave. En el documento EP 2 505 217 A2 se dan a conocer un sistema y un procedimiento de recolección de muestras biológicas automatizados

5 **[0012]** Por consiguiente, antes de la presente divulgación, no se realizó ni se dio a conocer ningún sistema automatizado de inyección dirigida a estructuras embrionarias. Por consiguiente, la presente invención se dirige a un sistema de inyección novedoso, que es capaz de administrar sustancias de manera automática, segura y eficaz a embriones aviares en desarrollo.

## 10 **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

**[0013]** Un objetivo de la presente invención es proporcionar un sistema novedoso, inventivo y útil para la inyección de una sustancia en una localización específica en un embrión aviar en desarrollo o en una localización específica en el huevo que contiene el embrión aviar. De manera ideal el sistema comprende 1) un medio para la apertura aséptica de los huevos; 2) un medio para detectar la localización de los embriones; 3) un medio para la adquisición y almacenamiento de embriones e información de posicionamiento del dispositivo; 4) un medio para el direccionamiento y movimiento de una aguja hasta una posición de inyección de la sustancia en la localización específica; y 5) un medio para el cierre/sellado de manera aséptica de huevos, para permitir que los embriones se continúen desarrollando y finalmente eclosionen.

20 **[0014]** Estas y otras realizaciones se dan a conocer o serán evidentes a partir de la siguiente Descripción Detallada y están comprendidas en la misma.

## 25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

**[0015]** La siguiente Descripción Detallada, proporcionada para describir la invención a modo de ejemplo, pero que no pretende limitar la presente invención a realizaciones específicas descritas, puede entenderse en conjunto con las Figuras que la acompañan, incorporadas en el presente documento por referencia, en las cuales:

30 La FIGURA 1 representa una realización a escala de laboratorio del sistema de inyección (1) de acuerdo con la divulgación;

La FIGURA 2A representa una sección transversal de un medio de retención del huevo e iluminación (50) del sistema de inyección. Cada medio de retención del huevo comprende: una copa de presión negativa/vacío (51); una manta (52); una base de enfriamiento (53); una fuente de luz (54); vidrio de seguridad (55); y una cámara de presión positiva (56). Cuando el huevo está presente sobre el medio de retención del huevo (50), se forma una cavidad de aire (57). A lo largo de la divulgación, los huevos serán indicados en las Figuras mediante (100) y los embriones se indicarán mediante (101);

La FIGURA 2B representa dos medios de retención del huevo e iluminación consecutivos (50);

La FIGURA 2C representa dos medios de retención de huevo e iluminación consecutivos (50), representados de manera transparente, para mostrar regiones mantenidas por encima (sobrepresión) y por debajo (vacío) de la presión ambiental;

La FIGURA 3 muestra imágenes representativas obtenidas utilizando la funcionalidad de captura de imagen de un sistema de inyección de acuerdo con la divulgación;

La FIGURA 4 ilustra cómo se procesan las imágenes para detectar la localización del embrión;

45 La FIGURA 5 representa un soporte de aguja (202) equipado con un medio vibratorio (203) para mover la aguja en dirección a y lejos de una posición z objetivo;

La FIGURA 6 muestra un soporte de aguja (202) equipado con un muelle (204) y electroimanes (205) para mover la aguja de manera deslizante en un cilindro vacío (206), en dirección a y lejos de una posición z objetivo;

La FIGURA 7A representa una configuración de un conjunto de direccionamiento/inyección de aguja (300) de acuerdo con la divulgación. La aguja (201) se mueve hasta que la punta de la aguja alcance la posición z determinada previamente. El conjunto de direccionamiento se programa para detener el movimiento de la aguja cuando la cámara reciba una señal de luz fuerte, que es la luz láser que se refleja de la punta de la aguja;

La FIGURA 7B representa una realización particular de un conjunto robotizado de direccionamiento/inyección de aguja (300). Las características indicadas son el eje z (320), el eje de inyección (321), orificios de conjunto (322), que determinan el ángulo de inyección para la unidad de inyección (200), el eje y (323), el láser (301), el medio de ajuste del rayo láser (324), la óptica de la cámara (325) y la cámara (303);

La FIGURA 7C representa otra vista del conjunto (300);

La FIGURA 8 representa una realización del medio de apertura (2) equipado con una cabeza del láser para corte (5a), o un medio alternativo de apertura por perforación (5b). También se indican una fuente de láser (3), espejos (4) para dirigir la luz láser a la cabeza del láser (5a), un escáner de triangulación láser (6) y un robot portátil (8) para mover varios componentes para lograr la apertura de los huevos;

La FIGURA 9A representa un medio de cierre de huevo (400) de acuerdo con la divulgación. En esta realización se muestra una unidad de calefacción (401) y un medio de estampación (402), para aplicar un material de sellado (403), que puede ser un cuadrado de parafilm o cualquier otro material de sellado adecuado;

La FIGURA 9B representa otra realización de un medio de cierre de huevo (400) de acuerdo con la divulgación;

La FIGURA 10 presenta una bandeja de incubadora estándar con una bandeja de inyección correspondiente (20) de

acuerdo con la divulgación. La bandeja (20) comprende una matriz de medios de retención de huevo e iluminación (50), tal como se expone en las FIGURAS 2A-C;

La FIGURA 11 es un diagrama que muestra «procedimiento de detección de aguja 1 - Región de Interés (ROI) estática». Los procedimientos de detección de aguja se llevan a cabo antes de la detección de posición x e y de inyección. En este procedimiento, la aguja se mueve desde una primera posición (a) hasta que la punta de aguja se posiciona en el campo de enfoque de la cámara (b). El campo de enfoque se define de forma manual, antes de la detección de la aguja;

La FIGURA 12 es un diagrama que muestra «procedimiento de detección de aguja 2 - ROI dinámica». En este procedimiento, la aguja se mueve a través del plano de enfoque de la óptica de la cámara. Después de definir los intervalos, la aguja se detiene y se obtiene una imagen de la punta de la aguja. Después de haber obtenido una secuencia de imágenes (es decir, la aguja pasó el plano focal una vez), se analizaron las imágenes. La ROI para el análisis siempre se sitúa en la región de la punta de la aguja, de tal modo que la punta de la aguja se encuentre de manera definitiva en la ROI. Para cada imagen se lleva a cabo una detección de bordes. La imagen con el número más alto de bordes detectados representa el plano focal. (a) por debajo del plano focal; (b) por encima del plano focal; y (c) en el plano focal. Por consiguiente, la localización de la punta de la aguja en la imagen en el plano focal (c), es la localización de la punta de la aguja;

La FIGURA 13 es un diagrama que muestra cómo se puede medir la distancia hasta el objetivo (la «posición z»). En el procedimiento 1, la cámara se mueve hacia arriba y abajo mientras obtiene imágenes de manera continua hasta que se tome la imagen más *nítida*. La detección de la nitidez se puede llevar a cabo utilizando la detección de bordes, así como midiendo la variación dentro de la imagen. Para aumentar la precisión de la nitidez detectada, se puede determinar una ROI en las imágenes obtenidas;

La FIGURA 14 es un diagrama que muestra un segundo procedimiento de detección de posición z - medición de distancia mediante el contacto. Después de que se posiciona la aguja en el plano focal de la cámara de vídeo, se mide la distancia entre la aguja y la superficie del huevo. Se proyecta una luz sobre la superficie de huevo y la aguja se mueve hacia delante hasta que toque la superficie de huevo. Se puede detectar el tiempo exacto en el que la aguja alcanza la superficie mediante la medición de cambios en la reflexión (es decir, tal como se detecta mediante la captura continua de imágenes por la cámara de vídeo). Cuando se detecta un cambio de intensidad en la imagen (causado por la reflexión de la fuente de luz), la aguja ha alcanzado la superficie del huevo;

La FIGURA 15 es un diagrama que muestra un tercer procedimiento de detección de posición z - medición de distancia mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) Después de posicionar la aguja en el plano focal de la cámara de vídeo, se utiliza un sistema de imágenes de OCT para medir la posición z. La luz de OCT se guía por la misma óptica que la luz visible para la cámara de vídeo y se obtiene de manera continua una imagen en 2D de la superficie del huevo. Para la detección de la posición z de la superficie del huevo, la cámara, conjuntamente con la aguja, se mueve hacia abajo hacia la superficie del huevo. Las imágenes de OCT en 2D obtenidas de manera continua detectan el momento exacto en el que la aguja toca la superficie del huevo;

La FIGURA 16 es un diagrama que muestra un procedimiento alternativo de cierre de los huevos. Tal como se muestra, los orificios pueden cerrarse utilizando cintas no adhesivas que pueden almacenarse en pilas. La ventaja de este procedimiento es que la cola se coloca sobre la cinta inmediatamente antes del procedimiento de cierre, lo que minimiza la manipulación de la cinta. Las cintas no adhesivas pueden almacenarse en pilas sin ningún tipo de papel de embalaje. En este procedimiento de cierre, primero se recoge la cinta mediante una copa de succión al vacío (1); se rocía con cola/agua, en el caso de una «cinta adhesiva húmeda» (similar a un sello) (2); y, finalmente, se coloca sobre el orificio, sellando de este modo el huevo (3).

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

**[0016]** En un primer objetivo, la presente divulgación proporciona un sistema de inyección con direccionamiento a estructura embrionaria (de aquí en adelante «ESTIS» o «el Sistema») para inyectar una sustancia en una localización específica dentro de un embrión aviar en desarrollo o en una localización específica dentro del huevo que contiene al embrión.

**[0017]** En una realización del primer objetivo, el ESTIS comprende un medio para cortar de manera aséptica la cáscara exterior de un huevo, de tal modo que una parte definida de la cáscara se prepara para extracción posterior. El ESTIS puede comprender adicionalmente: un medio para extraer la parte de cáscara definida para generar una apertura en el huevo; un medio para mapear (o direccionar) las coordenadas x, y, z de estructuras embrionarias para localizar el lugar de inyección específico deseado; un medio para inyectar la sustancia específica en el lugar de inyección específico; un medio para sellar de manera aséptica la apertura; combinaciones de cualquiera de los medios anteriores; o todos los medios anteriores.

**[0018]** De este modo, en una realización particular, el aparato comprende: un medio para cortar de manera aséptica la cáscara exterior de un huevo, de tal modo que una parte definida de la cáscara se prepara para la extracción posterior. El ESTIS puede comprender adicionalmente: un medio para extraer la parte de cáscara definida para generar una apertura en el huevo; un medio para mapear (o direccionar) las coordenadas x, y, z de estructuras embrionarias para localizar el lugar de inyección específico deseado; un medio para inyectar la sustancia específica en el lugar de inyección específico; y un medio para sellar de manera aséptica la apertura.

**[0019]** En una realización, el aparato comprende un conjunto de transferencia de huevos, que es capaz de mover

huevos desde su posición de incubación (extremo despuntado orientado hacia la parte superior) hasta su posición de inyección (extremo puntiagudo orientado hacia la parte inferior, accesible a la aguja de inyección).

5 **[0020]** En otra realización, el aparato comprende un soporte o bandeja de huevos que comprende: un medio de inmovilización del huevo, que emplea vacío o un medio mecánico adecuado para fijar la posición del huevo o pluralidad de huevos; y una fuente de luz o pluralidad de fuentes de luz, que es un componente del medio de mapeo.

10 **[0021]** En una realización, el soporte o la bandeja es desinfectable, biocompatible y compatible con bandejas de incubación estándares.

**[0022]** En una realización, el aparato comprende un medio de aplicación de presión, que sirve para aplicar una presión positiva a la cavidad de aire en el extremo despuntado del huevo para disminuir la profundización del embrión (reubicación) después de la apertura del huevo.

15 **[0023]** En una realización, el aparato comprende un medio de enfriamiento para enfriar la fuente de luz o pluralidad de fuentes de luz.

20 **[0024]** En una realización, la fuente de luz se selecciona entre luz blanca y un color específico de luz, en donde el color específico de luz se puede producir de manera opcional utilizando filtros ópticos en combinación con la fuente de luz blanca.

25 **[0025]** En una realización, el aparato se utiliza para la administración mediante la inyección de una cantidad específica de fluido en la localización específica del embrión o huevo aviar 120 horas antes de la post-fecundación; y en donde el huevo se incuba hasta la eclosión del pollito.

**[0026]** En una realización, el medio para cortar es un láser de CO<sub>2</sub>, un láser LED de alta potencia o un medio de corte mecánico. El medio de corte mecánico puede ser, por ejemplo, un perforador de diamante o carburo.

30 **[0027]** En una realización, el medio para mapear las coordenadas x, y, z comprende una cámara y un microprocesador.

**[0028]** En una realización, la luz LED es verde (longitud de onda central 535 nm, intervalo 520 nm – 550 nm); azul (longitud de onda central 450 nm, intervalo 440 nm – 470 nm); amarilla (longitud de onda central 590 nm, intervalo 575 nm – 610 nm); o NIR (onda central 1200 nm, intervalo entre 1000 nm y 1400 nm). En una realización particular, la luz LED es verde.

35 **[0029]** En otra realización, el lugar de la inyección es un vaso sanguíneo o el corazón. En una realización particular, el lugar es el corazón y el volumen de la sustancia administrada/inyectada es de 5 µl.

40 **[0030]** En un segundo objetivo, que no es de acuerdo con la presente invención, la presente divulgación proporciona un procedimiento para inyectar de manera segura de una sustancia en un lugar específico de un embrión aviar o el huevo que contiene al embrión, que comprende las etapas de:

- 45 a. abrir un huevo aviar fecundado;  
 b. inyectar una sustancia en un lugar específico del embrión o huevo; y  
 c. sellar la abertura en la cáscara de huevo, inyectando de este modo de manera segura la sustancia en el lugar específico del embrión o huevo aviar.

**[0031]** En una realización particular del segundo objetivo, el procedimiento se lleva a cabo utilizando el aparato de inyección con direccionamiento a la estructura embrionaria (ESTIS), tal como se da a conocer anteriormente.

50 **[0032]** En otra realización del segundo objetivo, el procedimiento comprende las etapas de:

- a. detectar y localizar el embrión y sus estructuras sin alterar físicamente la cáscara del huevo;  
 b. penetrar la cáscara del huevo, pero no la membrana del huevo, de tal modo que una parte definida de dicha cáscara de huevo pueda ser extraída mediante una etapa de extracción posterior; y  
 c. extraer la parte definida de la cáscara de huevo, dejando una abertura en dicha cáscara de huevo. En otra

55 realización del segundo objetivo, el procedimiento comprende las etapas de:

- a. detectar las coordenadas x e y para el embrión y sus estructuras;  
 b. detectar la coordenada z, que representa la distancia entre el medio de corte y la superficie de la cáscara de huevo;  
 c. determinar una estructura objetivo deseada, definida por las coordenadas x e y, en la que se inyectará una sustancia;  
 d. colocar una punta de aguja de inyección suficientemente cerca del objetivo determinado para permitir la inyección en la estructura embrionaria objetivo deseada; y  
 e. inyectar la sustancia en la estructura.

65 **[0033]** En otra realización del segundo objetivo, el procedimiento comprende las etapas de:

- a. detectar y localizar el embrión y sus estructuras sin alterar físicamente la cáscara del huevo mediante:

- 5
- i. detectar las coordenadas x e y para el embrión y sus estructuras;
  - ii. detectar la coordenada z, que representa la distancia entre el medio de apertura y la superficie de cáscara de huevo;
  - 5 iii. determinar una estructura objetivo deseada, definida por las coordenadas x, y y z, en la que se inyectará una sustancia;
  - b. penetrar la cáscara de huevo, de tal modo que una parte definida de dicha cáscara de huevo pueda ser extraída mediante una etapa de extracción posterior; y
  - 10 c. extraer la parte definida de la cáscara de huevo, dejando una abertura en dicha cáscara de huevo.
  - d. colocar una punta de aguja de inyección suficientemente cerca de la estructura objetivo determinada para permitir la inyección en la estructura objetivo deseada; y
  - e. inyectar la sustancia en la estructura.

15 **[0034]** En otra realización del segundo objetivo, el procedimiento comprende las etapas de rotación del huevo o pluralidad de huevos, desde su posición de incubación, en la que el extremo despuntado del huevo está orientado hacia arriba, hasta una posición de inyección, en la que el extremo puntiagudo del huevo está orientado hacia arriba, de tal modo que sea accesible para la aguja de inyección.

20 **[0035]** En una realización, la rotación se logra utilizando un conjunto de copa de vacío.

**[0036]** En otra realización, el huevo o pluralidad de huevos se coloca sobre un soporte o una bandeja de huevos, cuyo soporte o bandeja comprende:

- 25
- a. un medio de inmovilización del huevo que utiliza o vacío o un medio mecánico adecuado para fijar la posición del huevo o pluralidad de huevos; y
  - b. una fuente de luz o una pluralidad de fuentes de luz.

30 **[0037]** En otra realización del segundo objetivo, el procedimiento comprende la aplicación de presión positiva a la cavidad de aire en el extremo despuntado del huevo para evitar el ahondamiento del embrión después de la apertura del huevo.

35 **[0038]** En otra realización del segundo objetivo, el procedimiento comprende dirigir la luz a través del huevo, desde el extremo despuntado hasta el extremo puntiagudo, hasta una unidad de detección, que es un componente del medio de mapeo, de tal modo que la unidad de detección esté posicionada en el lado opuesto del huevo con relación a la fuente de luz. La unidad de detección puede ser un sensor de área (CMOS o CCD). El detector puede estar fabricado de silicio o un material sensible a NIR. En una realización, el material sensible a NIR es arseniuro de indio y galio.

40 **[0039]** En una realización, la unidad de detección comprende una óptica que incluye unas lentes ajustables para afinar el enfoque de la óptica con la superficie del huevo. Se puede obtener, digitalizar y posteriormente transmitir una imagen a una unidad de procesamiento de imágenes. En una realización, la unidad de procesamiento de imágenes puede registrar las coordenadas x e y del embrión debajo de la cáscara de huevo y transmitir las coordenadas x e y al medio de corte.

45 **[0040]** En una realización, la superficie de la cáscara de huevo o la coordenada z, se detecta mediante un sensor de distancia, que puede ser ultrasónico, óptico 1D o de triangulación láser en 2D o un sensor de tomografía de coherencia óptica en 2D o 3D; y en donde la coordenada z detectada representa la distancia entre la cáscara del huevo y el dispositivo de apertura.

50 **[0041]** En una realización, el medio de corte se coloca utilizando una etapa de traslación lineal de 3 ejes, una etapa de traslación lineal de 5 ejes, una unidad robotizada portátil de 3 ejes, una unidad robotizada portátil de 5 ejes o un brazo robótico de montaje selectivamente adaptable (SCARA); o en donde el huevo se mueve a una posición bajo un medio de corte que permanece fijo.

55 **[0042]** En otra realización, el medio de apertura comprende un dispositivo óptico seleccionado entre un láser de CO<sub>2</sub>, un láser de Nd:YAG, un láser de NIR y cualquier láser con una longitud de onda de trabajo de desde aproximadamente 1 μm hasta aproximadamente 50 μm; o comprende un dispositivo mecánico seleccionado entre una perforadora, una perforadora hueca, una perforadora de diamante y una perforadora de carburo. El medio de apertura puede comprender adicionalmente un escáner 2D.

60 **[0043]** En una realización, se puede realizar la abertura mediante una unidad de perforación, que perfora un tubo hueco a través de la cáscara del huevo.

65 **[0044]** En otra realización, el medio de apertura corta solamente la cáscara de huevo o corta también la membrana de la cáscara de huevo y en donde la línea de corte no se limita a cualquier forma geométrica fija, sino que en cambio se ajusta libremente.

**[0045]** En una realización, la extracción de la parte definida de la cáscara de huevo se lleva a cabo con una taza de

succión al vacío, succión al vacío sin contacto o un brazo mecánico. La extracción puede incluir de manera opcional la extracción de una parte definida de la membrana de cáscara de huevo.

5 **[0046]** En una realización, la detección de las coordenadas  $x$  e  $y$  del embrión se repite para adquirir y digitalizar una imagen del embrión. Se puede transmitir la imagen a una unidad informática donde el software de procesamiento de imágenes calcula/determina un punto de inyección adecuado, definido por las coordenadas  $x$ ,  $y$  y  $z'$ , en donde  $z'$  representa la distancia entre la unidad de inyección y la estructura embrionaria. En la realización, la estructura embrionaria se selecciona entre un corazón, una cámara del corazón, un vaso sanguíneo, una vena, una arteria y cualquier otra estructura del sistema de vasos sanguíneos.

10 **[0047]** En una realización, la coordenada  $z'$  se determina utilizando tomografía de coherencia óptica, medición con ultrasonido, triangulación láser 1D o triangulación láser 2D.

15 **[0048]** En otra realización del segundo objetivo, las coordenadas del punto de inyección se envían a los medios de inyección. En dicha realización, la punta de una aguja de inyección se posiciona en las coordenadas  $x$ ,  $y$  y  $z'$  utilizando una etapa de traslación lineal de 3 ejes, una etapa de traslación lineal de 5 ejes, una unidad robotizada portátil de 3 ejes, una unidad robotizada portátil de 5 ejes o un SCARA.

20 **[0049]** En otra realización del segundo objetivo, el huevo se mueve hasta la aguja de inyección, de tal modo que la punta de la aguja se acerca a las coordenadas  $x$ ,  $y$  y  $z'$ . La aguja se puede posicionar entre aproximadamente  $0^\circ$  y aproximadamente  $90^\circ$  grados, con relación a las coordenadas del punto de inyección.

25 **[0050]** En otra realización del segundo objetivo, la aguja se posiciona mediante un sistema de direccionamiento (300), de manera sustancial tal como se representa en las FIGURAS 7A o 7B. Antes de la detección del embrión, se determina la posición "x" de la aguja y se guarda su valor. Se fija la posición "y". Cuando la aguja es alcanzada por el láser de direccionamiento (301), la cámara (303) detecta la luz reflejada. La geometría y los ángulos conocidos (es decir entre láser/cámara y láser/aguja) permiten el cálculo posterior de la posición "z" de la punta de aguja. Después de que se haya guardado la posición  $x$  de la aguja, se detectan las posiciones  $x$  e  $y$  del objetivo (vaso sanguíneo o corazón de embrión) utilizando la cámara de vídeo (también se guardan los valores). A continuación, el huevo y/o el sistema de direccionamiento se mueve para acercar las coordenadas  $x$  e  $y$  de la punta de la aguja al punto de inyección detectado. Finalmente, la configuración completa se mueve en la dirección  $z$  hasta que el rayo láser alcance el punto de inyección detectado en la imagen de la cámara. La geometría del conjunto asegura que cuando el rayo láser alcance el punto de inyección detectado, la punta de aguja también alcanzará la estructura embrionaria detectada.

35 **[0051]** En esta realización particular, un láser de direccionamiento (301) se monta sobre un soporte de la cámara (302), de tal modo que se forma un ángulo predeterminado, fijo (306) entre la trayectoria (304) del láser (301) y la línea que es perpendicular a la lente de captura de imagen de la cámara (303) (es decir, la dirección a la que apunta la cámara de manera fija). El ángulo entre la aguja (201) y la cámara (303) también está fijo, de tal modo que las únicas direcciones en las que se puede mover la aguja (independientemente de la cámara y la trayectoria del láser) son hacia o se alejan de la trayectoria del láser. Esta trayectoria del movimiento de la aguja se representa mediante la flecha lineal bidireccional, discontinua (310).

45 **[0052]** En otra realización del segundo objetivo, la aguja (201) se coloca en la estructura embrionaria utilizando movimiento lineal, movimiento oscilante, movimiento oscilante rápido o un movimiento de "pistola de inyección" de alta velocidad. En una realización particular, la aguja (201) está equipada con un motor de vibración, sustancialmente tal como se muestra en la FIGURA 5. De manera alternativa, la aguja puede estar equipada con electroimanes y un muelle, que proporciona una fuerza de empuje, de manera sustancial tal como se muestra en la FIGURA 6.

50 **[0053]** En otra realización del segundo objetivo, se inyecta una sustancia en la estructura embrionaria, y la sustancia se selecciona entre fluido, células, anticuerpo, vacuna, virus, bacteria, marcadores, ácidos nucleicos y cualquier otra sustancia adecuada.

55 **[0054]** En una realización, el sellado aséptico se lleva a cabo utilizando una membrana, que sella y protege el embrión en desarrollo, posibilitando su incubación. Se puede calentar la membrana hasta cerca de su punto de fusión para permitir que la membrana se adhiera a la cáscara del huevo. Además, se puede llevar a cabo el calentamiento utilizando una pistola de aire caliente, un sello flexible con fluido caliente circulante, una fuente de radiación, una fuente de infrarrojos o un láser.

60 **[0055]** En otra realización, el sellado aséptico se lleva a cabo utilizando una cinta autoadhesiva. Se puede colocar la cinta autoadhesiva para el sellado tal como se muestra en la Figura 9B. Se puede llevar a cabo el sellado de manera sustancial tal como se describe en la FIGURA 16.

**[0056]** En dicha realización, se puede sellar el huevo utilizando las siguientes etapas:

- 65
- 1) utilizar una taza de succión para recoger una lámina de sellado, desde una pila de láminas de sellado;
  - 2) rociar la lámina con un líquido que incluye cola y agua; y

3) depositar la lámina húmeda sobre la apertura del huevo, sellando de este modo el huevo.

**[0057]** En una realización particular, se inyectan más de 1.000 huevos por hora. En una realización incluso más particular, se inyectan más de 3.000 huevos por hora.

5 **[0058]** Cabe indicar que en esta divulgación, los términos tales como “comprende”, “comprendido”, “que comprende”, “contiene”, “que contiene” y similares pueden significar “incluye”, “incluido”, “que incluye” y similares. Los términos tales como “que consiste esencialmente en” y “consiste esencialmente en” permiten la inclusión de ingredientes o etapas adicionales que no desmerecen las características novedosas o básicas de la presente invención, es decir, excluyen ingredientes o etapas no mencionadas adicionales que desmerezcan las características novedosas o básicas de la presente invención, y

10 **[0059]** excluyen ingredientes o etapas de la técnica anterior, tales como documentos de la técnica mencionados en el presente documento, especialmente debido a que un objetivo de este documento es definir las realizaciones que son patentables, por ejemplo, novedosas, no obvias, inventivas, sobre la técnica anterior, por ejemplo, sobre documentos mencionados en el presente documento. Y, los términos “consiste en” y “que consiste en” poseen el significado que estos términos son cerrados. Los términos singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra “o” pretende incluir “y” a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

20

## REIVINDICACIONES

1. Sistema de inyección con direccionamiento a estructura embrionaria (ESTIS) (1) para inyectar una sustancia en una localización específica dentro de un embrión aviar en desarrollo (101) o una localización específica de un huevo (100) que contiene un embrión aviar, que comprende:
- 5 un medio para cortar de manera aséptica (2) la cáscara exterior de un huevo, de tal modo que una parte definida de la cáscara se prepara para su extracción posterior;
- un medio para extraer la parte definida de la cáscara para producir una apertura en el huevo;
- 10 un medio para mapear o direccionar las coordenadas x, y, z (300) de las estructuras embrionarias para localizar la localización de inyección específica deseada que comprende una cámara (303) y un microprocesador;
- un medio para inyectar (200) la sustancia específica en la localización de inyección específica;
- un medio para sellar de manera aséptica (400) la abertura y un soporte o bandeja de huevos (20) que tiene un medio de inmovilización de huevos, que emplea vacío o un medio mecánico adecuado para fijar la posición del huevo o pluralidad de huevos, y una fuente de luz (54) o pluralidad de fuentes de luz, que es un componente del medio de mapeo,
- 15 **caracterizado por que** el sistema comprende adicionalmente un montaje de transferencia de huevos, que es capaz de mover huevos desde su posición de incubación, en donde el extremo despuntado está orientado hacia arriba, hasta su posición de inyección, en donde el extremo puntiagudo está orientado hacia arriba de tal modo que sea accesible para la aguja de inyección.
- 20
2. Sistema de la reivindicación 1, en el que el soporte o la bandeja es desinfectable, biocompatible y compatible con bandejas de incubación estándar.
3. Sistema de la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente un medio de aplicación de presión, que sirve para aplicar una presión positiva a la cavidad de aire en el extremo despuntado del huevo para disminuir el ahondamiento del embrión o reubicación después de la apertura del huevo.
- 25
4. Sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un medio de enfriamiento para enfriar la fuente de luz o pluralidad de fuentes de luz.
- 30
5. Sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fuente de luz se selecciona entre luz blanca y un color específico de luz, en el que el color específico de luz se puede producir de manera opcional utilizando filtros ópticos en combinación con la fuente de luz blanca.
- 35
6. Sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sistema está adaptado para inyectar una cantidad específica de fluido en la localización de inyección específica del embrión aviar, o la localización de inyección específica del huevo que contiene el embrión aviar, antes de las 120 horas después de la fecundación y, en el que el huevo se incuba hasta que el pollo eclosione.
- 40
7. Sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medio de corte es un láser de CO<sub>2</sub>, un láser LED de alta potencia o un medio de corte mecánico.
8. Sistema de la reivindicación 7, en el que el medio de corte mecánico es una perforadora de diamante o carburo.
- 45
9. Sistema de la reivindicación 7, en el que la luz LED es verde (longitud de onda central 535 nm, intervalo 520 nm – 550 nm); azul (longitud de onda central 450 nm, intervalo 440 nm – 470 nm); amarilla (longitud de onda central 590 nm, intervalo 575 nm – 610 nm); o NIR (onda central 1200 nm, intervalo entre 1000 nm y 1400 nm).
- 50
10. Sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la localización de la inyección es un vaso sanguíneo o el corazón.
11. Sistema de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la localización de la inyección es el corazón y el volumen de la sustancia es de 5 µl.

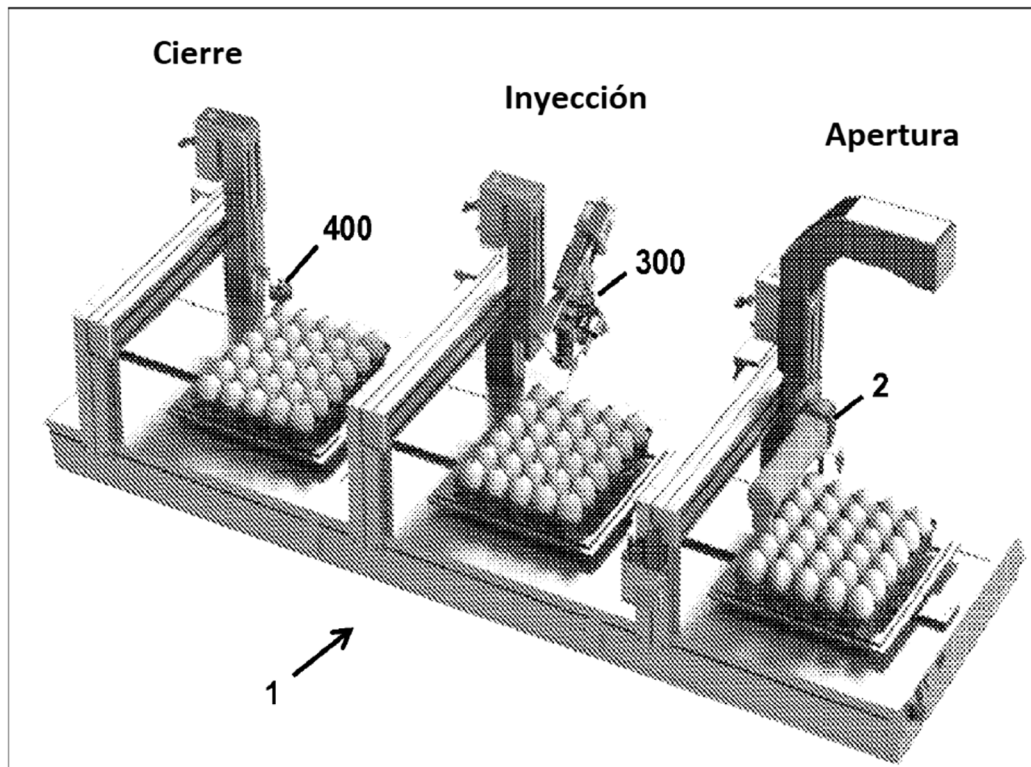


Fig. 1

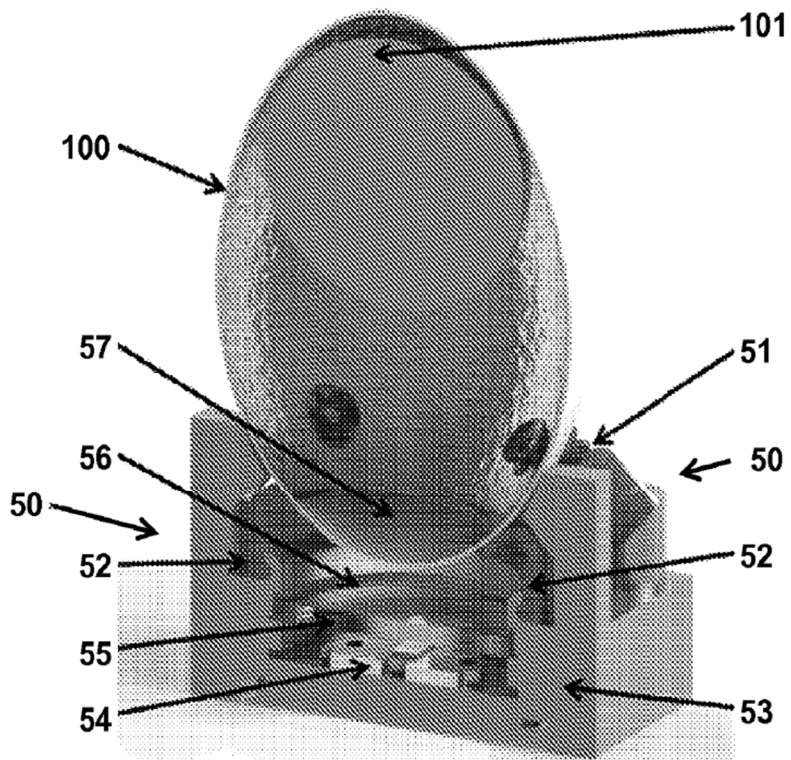
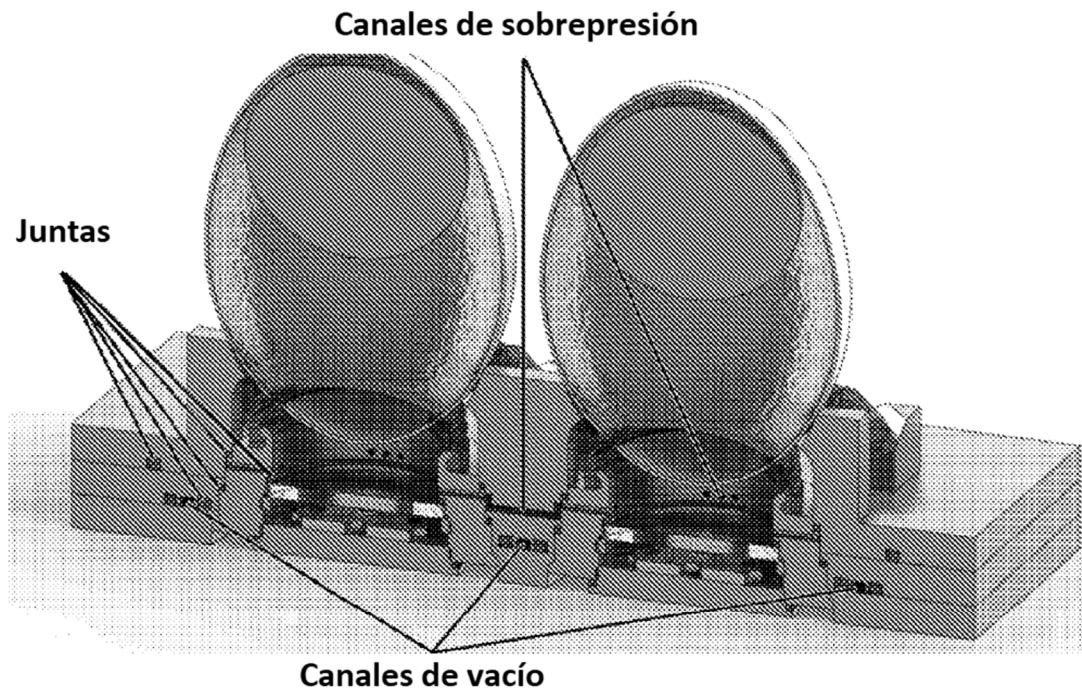
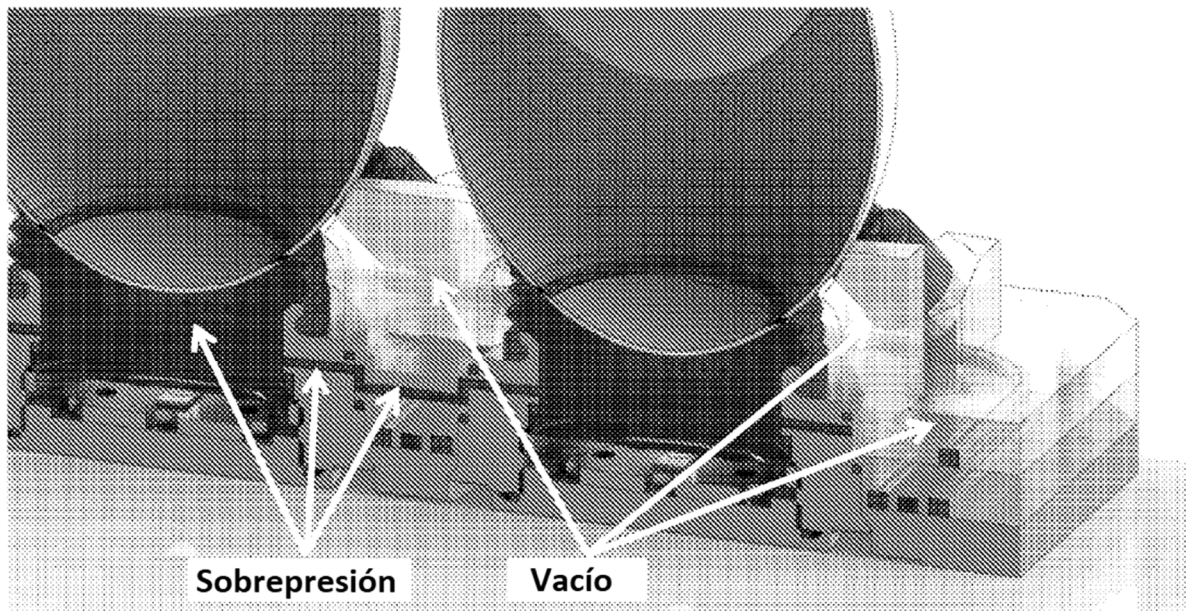


Fig. 2A



*Fig. 2B*



*Fig. 2C*

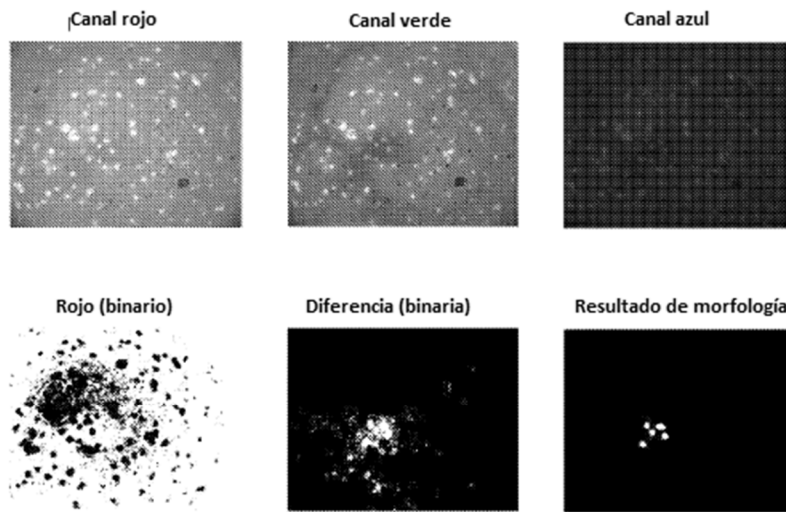


Fig. 3

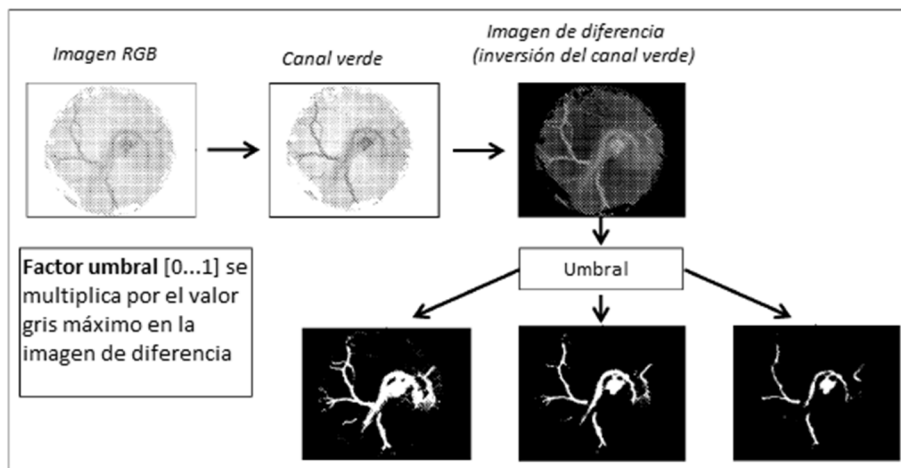
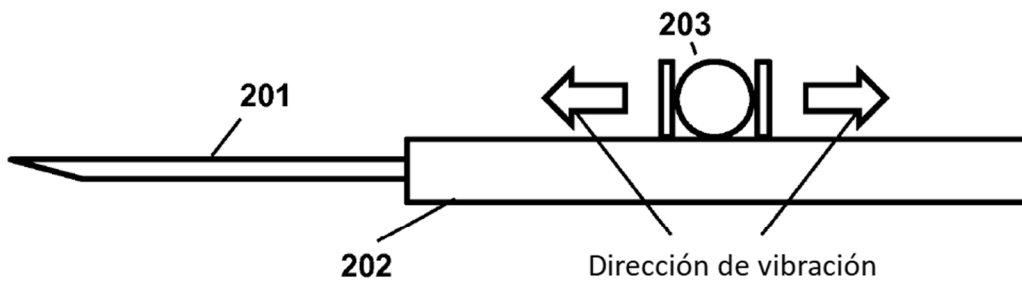
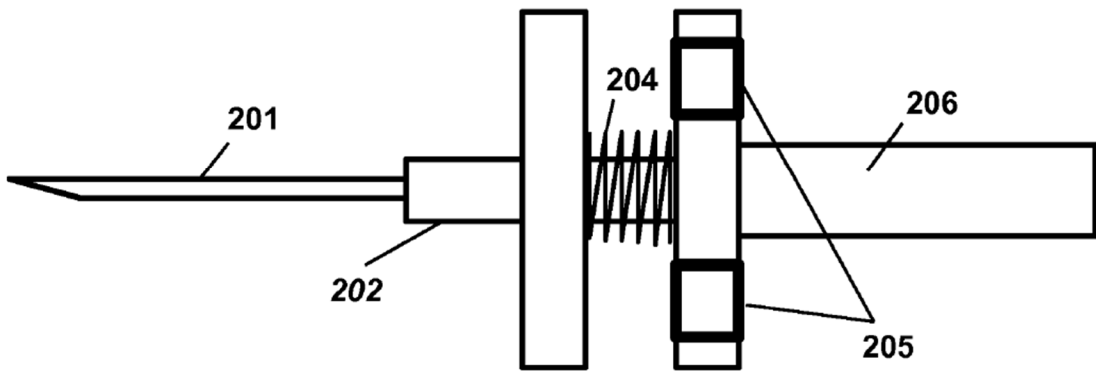


Fig. 4



*Fig. 5*



*Fig. 6*

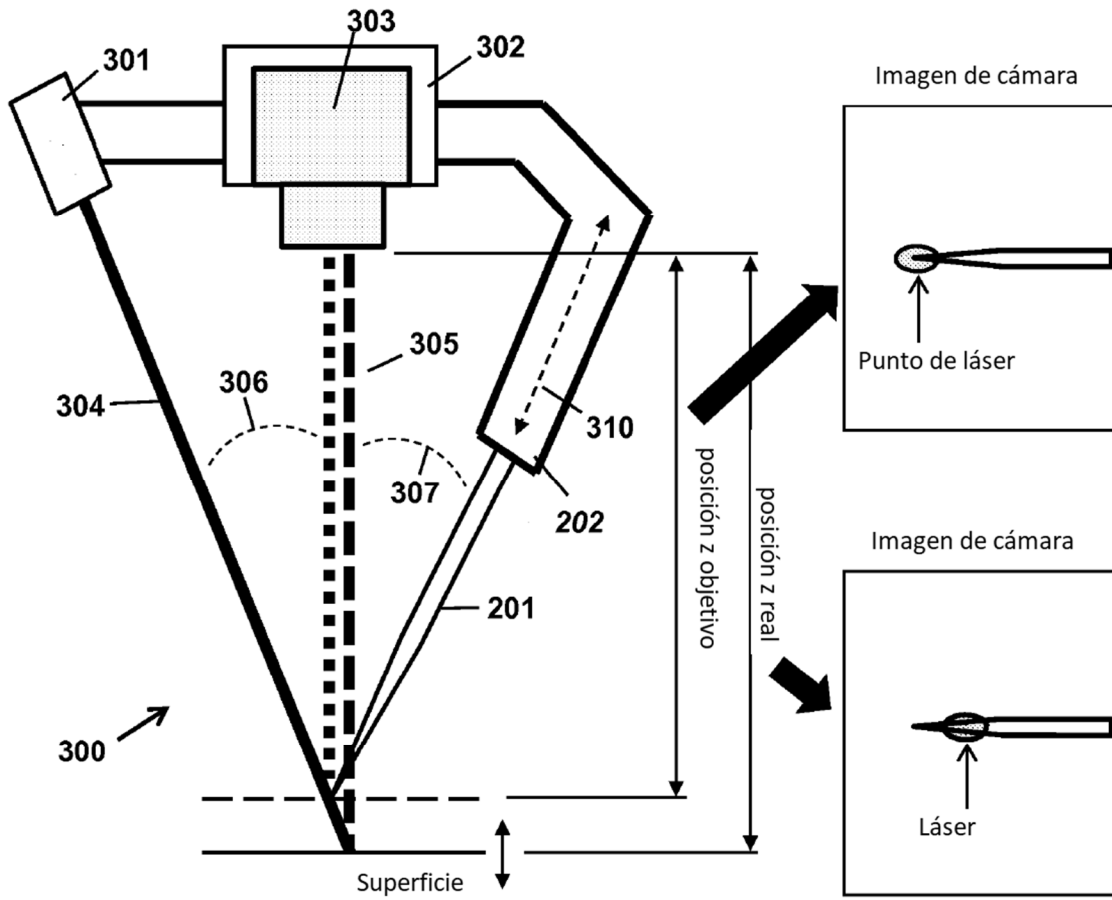
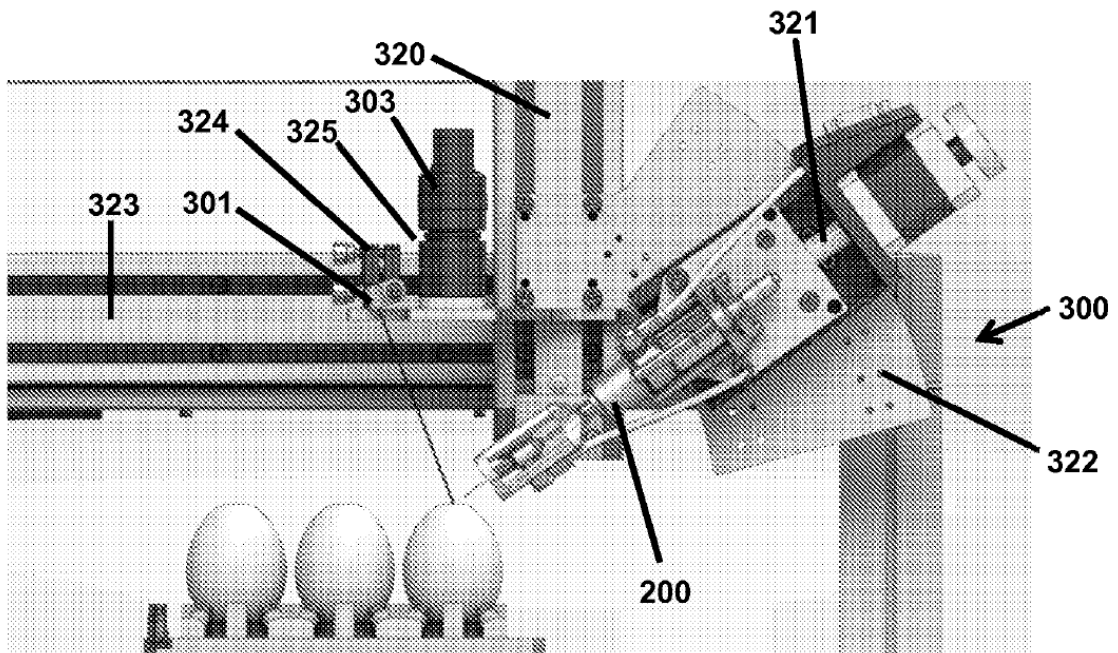
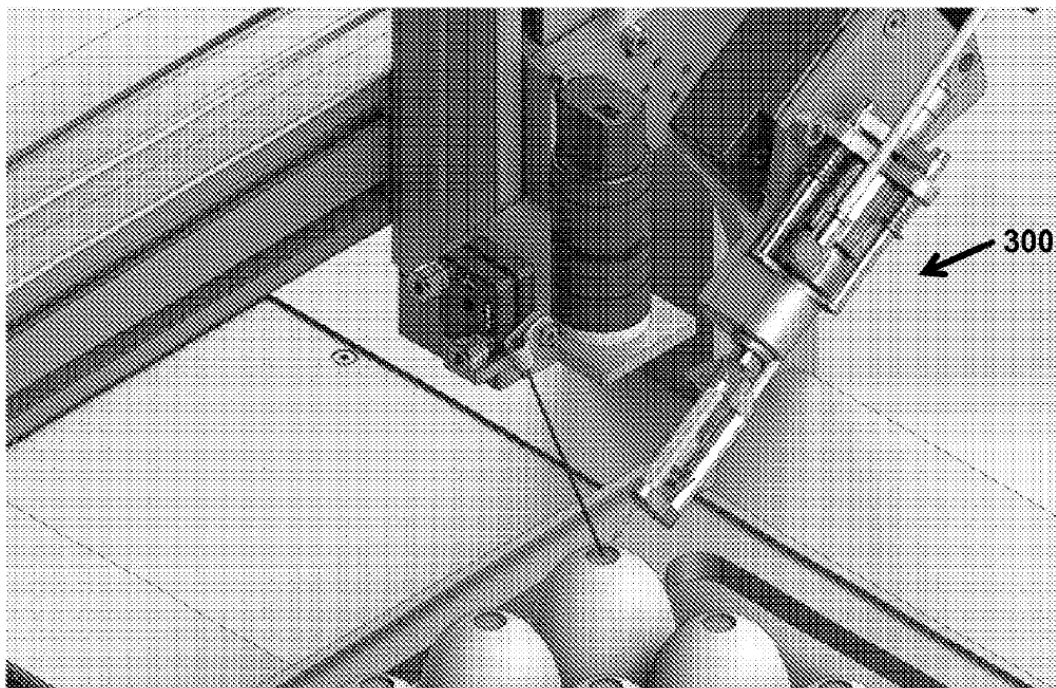


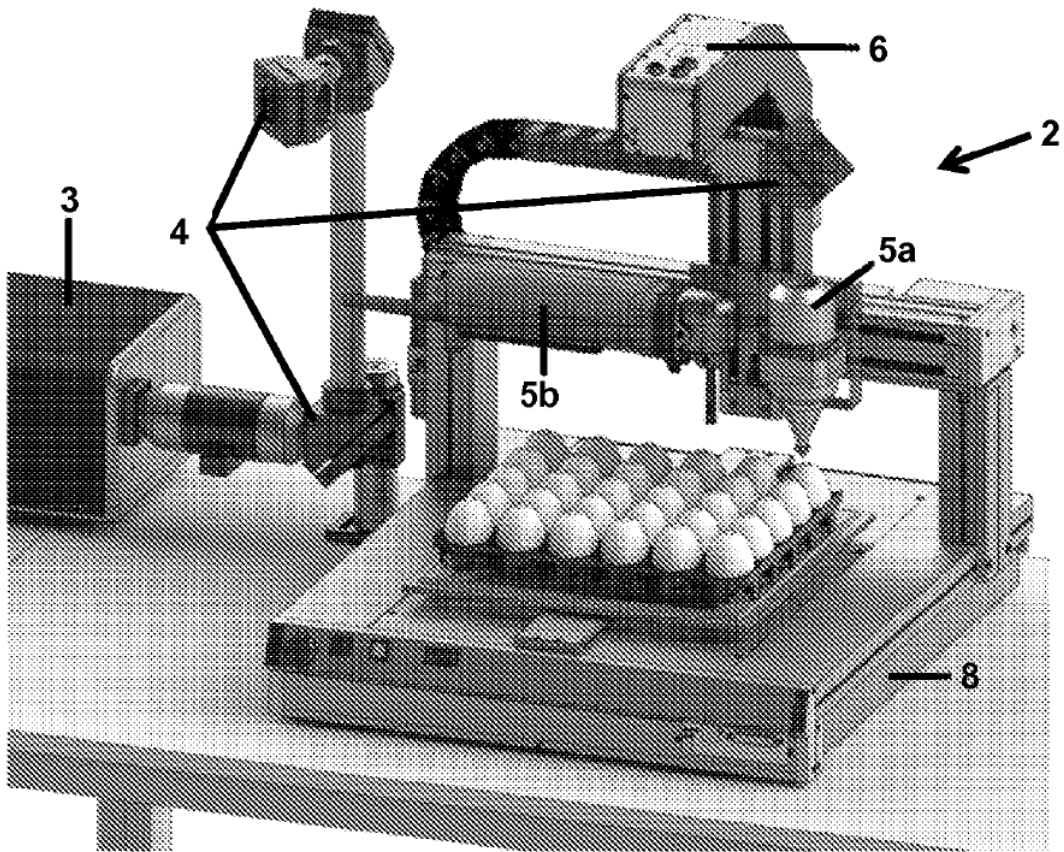
Fig. 7A



*Fig. 7B*



*Fig. 7C*



*Fig. 8*

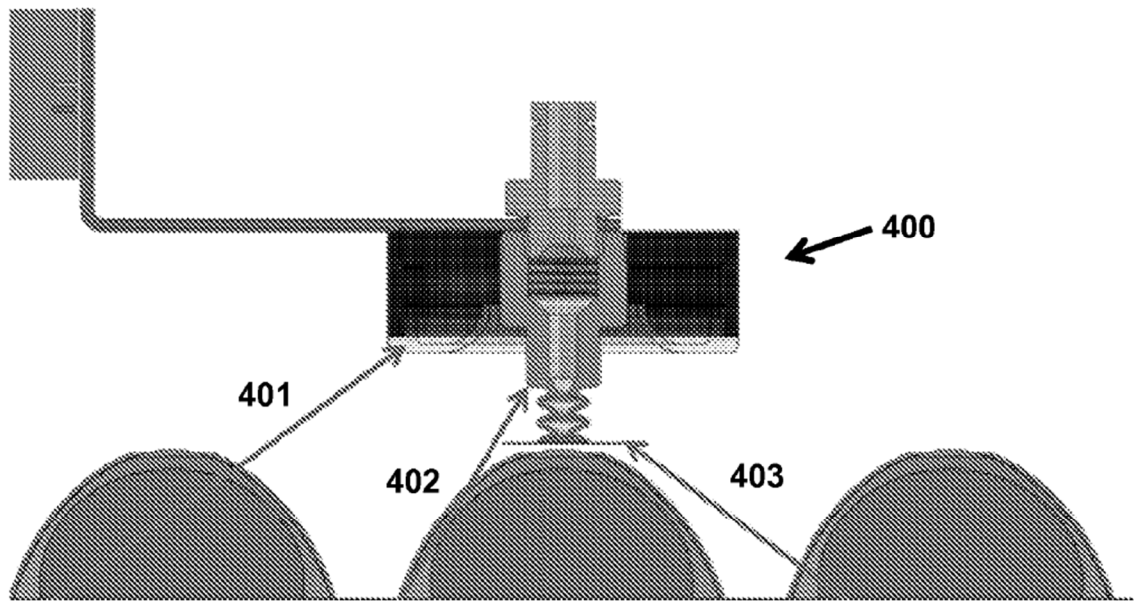


Fig. 9A

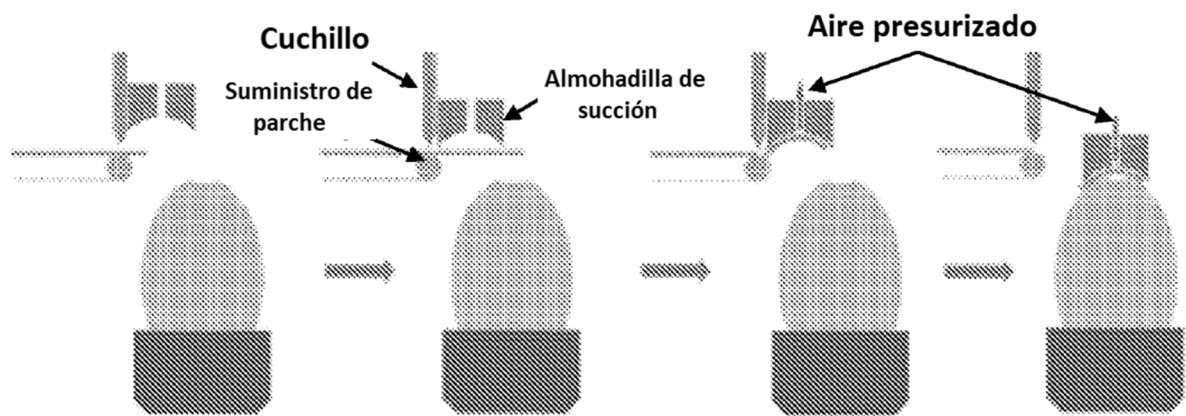
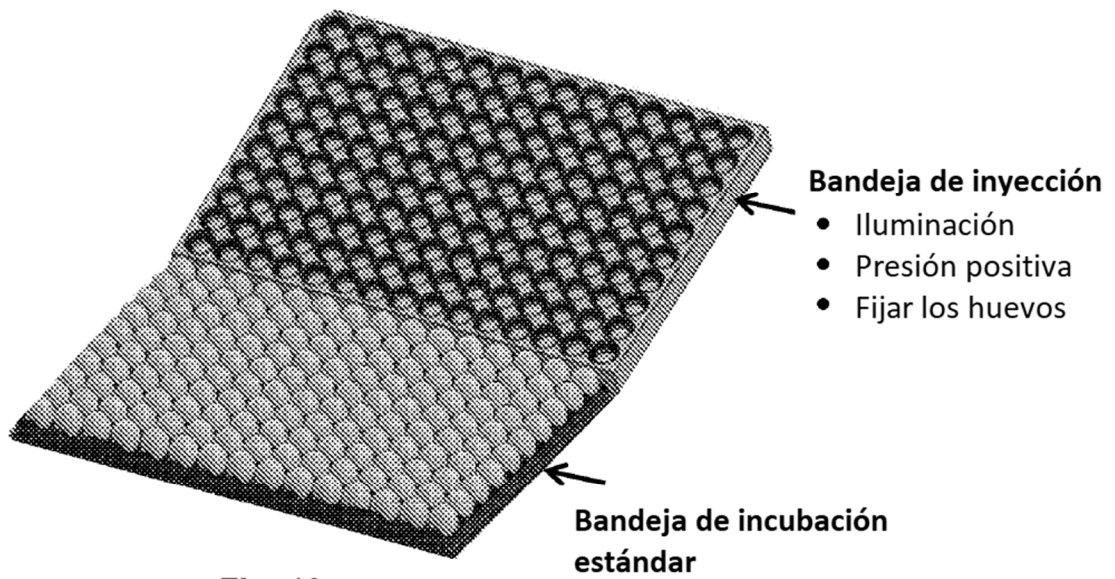
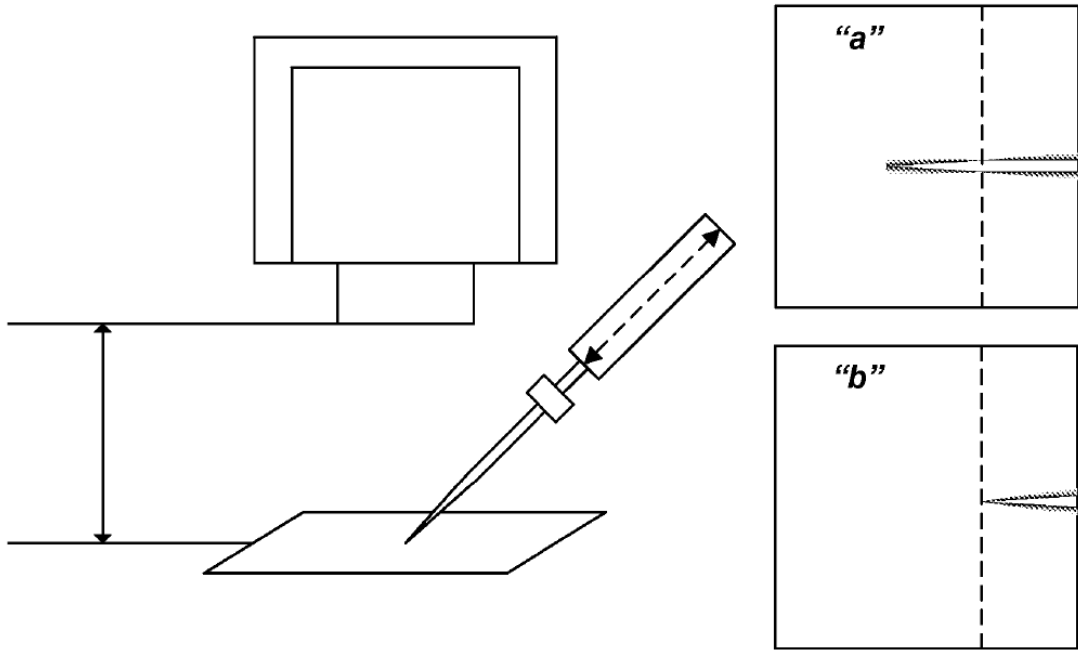


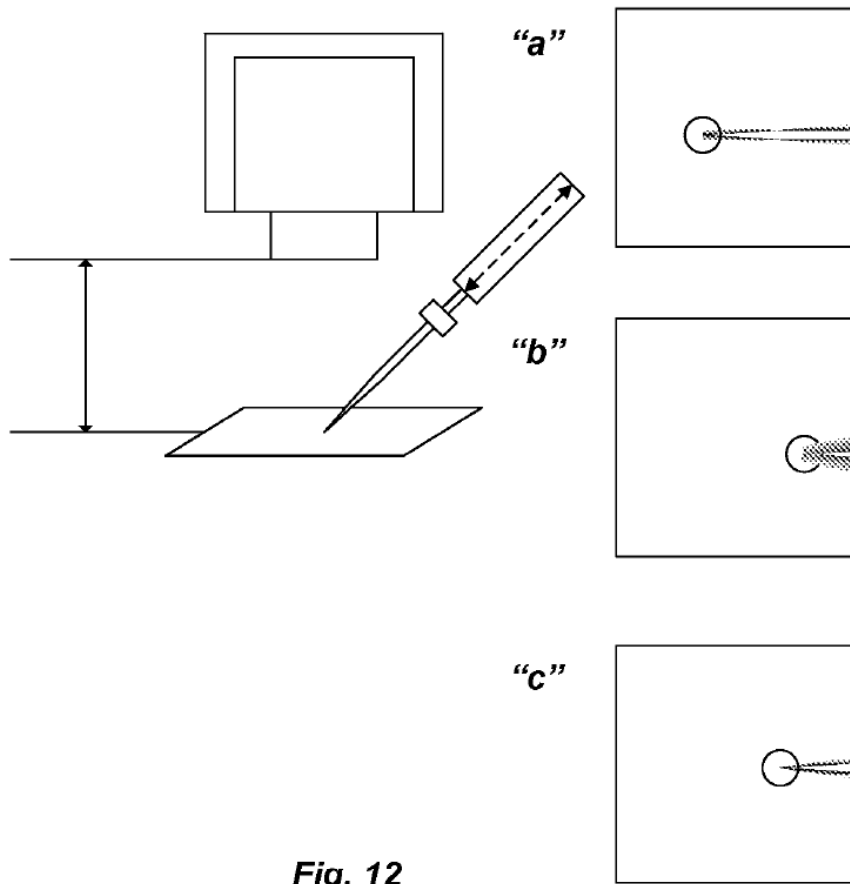
Fig. 9B



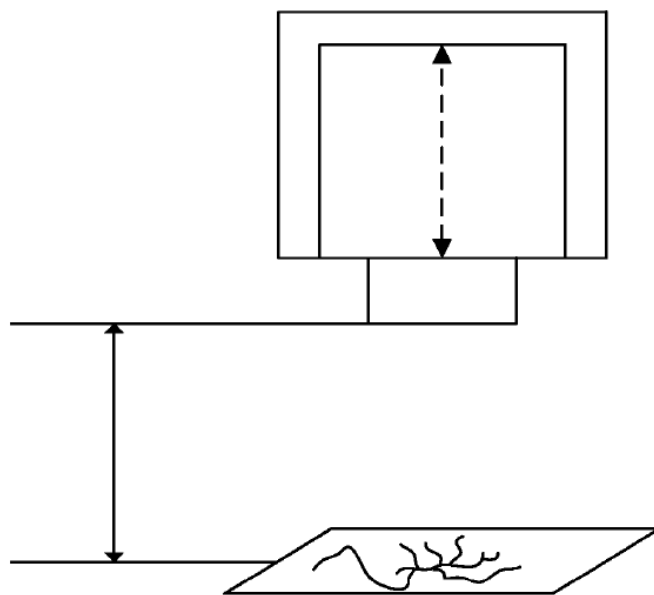
*Fig. 10*



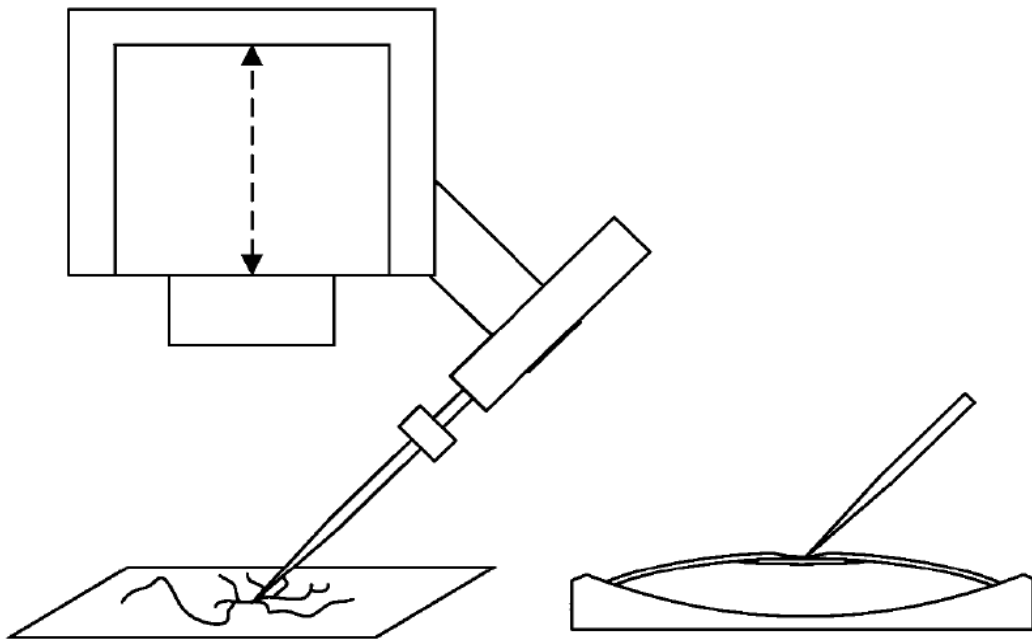
**Fig. 11**



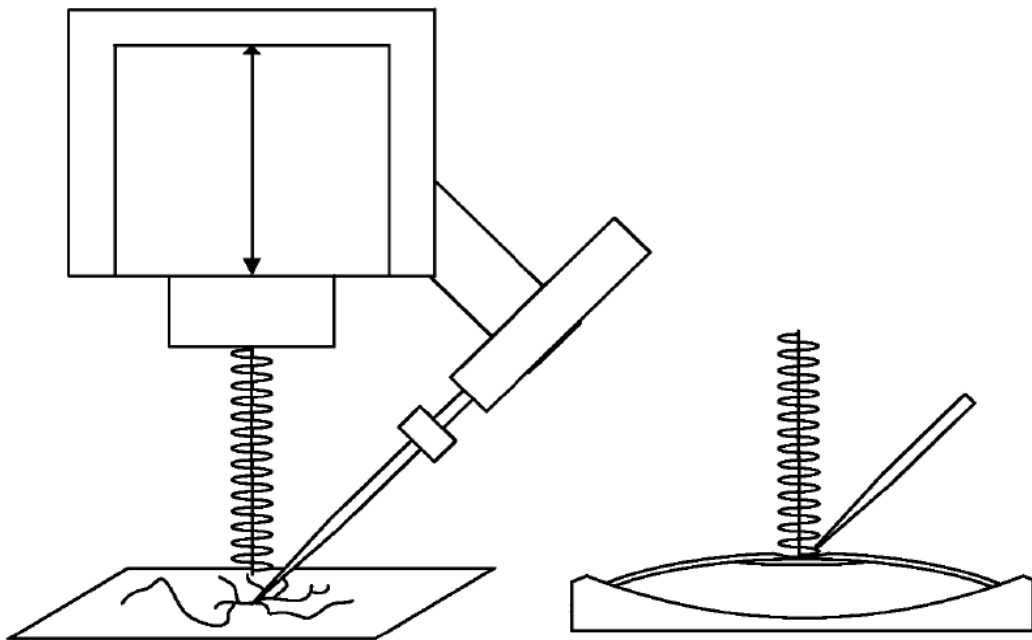
**Fig. 12**



**Fig. 13**

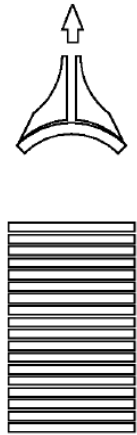


**Fig. 14**

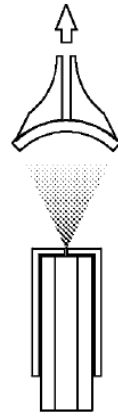


**Fig. 15**

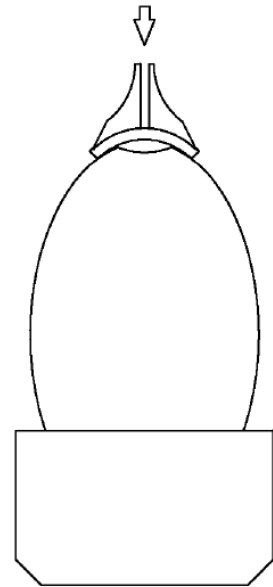
(1)  
coger de la pila



(2)  
nebulizar  
("befog")



(3)  
poner sobre el huevo



**Fig. 16**