

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 012 978**

51 Int. Cl.:

G01N 33/08 (2006.01)

A01K 43/00 (2006.01)

A01K 45/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2019** **PCT/EP2019/063870**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2019** **WO19229084**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2019** **E 19727648 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024** **EP 3803385**

54 Título: **Método para determinar el sexo de un embrión de pollo**

30 Prioridad:

30.05.2018 NL 2021022

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

10.04.2025

73 Titular/es:

SELEGGT GMBH (100.00%)
Hildeboldplatz 15-17
50672 Köln, DE

72 Inventor/es:

METER, TJITZE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 3 012 978 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para determinar el sexo de un embrión de pollo

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a un método para la determinación espectroscópica del sexo *in ovo* de huevos de aves fertilizados e incubados que comprende el paso de introducir ondas electromagnéticas en el interior del huevo. Más generalmente, la presente invención se refiere a un método para análisis espectroscópicos de huevos de aves fertilizados e incubados.

Técnica anterior

[0002] Se conoce el uso de la espectroscopia para determinar el sexo de un embrión de pollo. Por ejemplo, el documento CA2991603 se refiere a un método y a un dispositivo para introducir una abertura en la cáscara calcárea de huevos de aves incubados, que tienen embriones contenidos en la misma, en la región del extremo romo de los huevos incubados. Dentro de la región del extremo romo, hay una membrana exterior y una membrana interior, entre las cuales hay una cámara de aire. El dispositivo presenta un dispositivo de retención, en el que se colocan los huevos de ave incubados con el extremo puntiagudo orientado hacia abajo, donde el embrión se coloca adyacente a la membrana interna; un primer dispositivo de detección para determinar la posición y la geometría de la cámara de aire; y un dispositivo de apertura para introducir una abertura en la cáscara calcárea en el extremo romo del huevo de ave incubado por encima de la membrana interna tensada. Gracias a la apertura de la cáscara calcárea se puede realizar de manera fiable una determinación del sexo del embrión. Con ayuda de la apertura se puede determinar el sexo del embrión de forma no invasiva, por ejemplo con ayuda de métodos espectroscópicos como espectroscopia Raman y/o espectroscopia de fluorescencia. Los huevos de aves necesitan cerrarse de nuevo después de determinar el sexo. De este modo, se asegura un desarrollo adicional del embrión.

[0003] Además, el documento WO 2017/174337 se refiere a un método y a un dispositivo para la determinación óptica del sexo *in ovo* de huevos de aves fertilizados e incubados con los siguientes pasos: monitorizar la progresión temporal de la incubación hasta que se forma un vaso sanguíneo detectable, realizar un orificio en la cáscara de carbonato de calcio del huevo de ave, buscar el vaso sanguíneo que se forma en el huevo por medio de un sistema de visión, colocar el vaso sanguíneo, irradiar el vaso sanguíneo con una fuente de haz láser que emite una longitud de onda de excitación.

[0004] Registrar la radiación de retrodispersión del vaso sanguíneo irradiado por medio de un detector que está conectado a una unidad de evaluación. A estos les siguen los pasos de evaluar la radiación de retrodispersión, incluida la radiación fluorescente en la unidad de evaluación, a partir de la intensidad espectral registrada de la radiación fluorescente en un rango espectral desplazado hacia el rojo a la longitud de onda de excitación, donde las características específicas del sexo de la sangre masculina y de la sangre femenina están contenidas en la intensidad y en el perfil espectral de la radiación fluorescente registrada, y donde al menos uno de los valores de intensidad determinados a partir de las intensidades espectrales medidas de la intensidad de radiación fluorescente con respecto a la sangre masculina presentan un valor diferente evaluable en comparación con al menos uno de los valores de intensidad determinados con respecto a la sangre femenina en los vasos sanguíneos, determinar el sexo del huevo del ave a partir de la diferencia de al menos uno de los valores de los valores de intensidad fluorescente en la unidad de evaluación y, a continuación, mostrar al menos el sexo del embrión en el huevo de ave determinado en la unidad de evaluación.

[0005] Los métodos conocidos de determinación óptica del sexo *in ovo* implican demasiado riesgo para el embrión, en particular en un entorno industrial, porque el método conocido requiere grandes aberturas en la cáscara del huevo.

[0006] El documento DE102007013107 describe otro método invasivo de determinación del sexo *in ovo* en el que se forman dos aberturas en la cáscara del huevo y se introducen sondas dentro del huevo.

Sumario de la invención

[0007] La presente invención busca proporcionar un método para producir pollos donde la determinación del sexo de los embriones de pollo es más fiable, y adecuado para su aplicación a escala industrial, e implica menos riesgo para el embrión.

[0008] Además, la presente invención busca proporcionar un método para producir pollos que incluye determinar el sexo de los embriones de pollo, donde se resuelve al menos parcialmente un problema con los métodos conocidos.

[0009] Además, la presente invención busca proporcionar un método alternativo para producir pollos que incluye determinar el sexo de los embriones de pollo.

[0010] Por lo tanto, la invención proporciona un método según la reivindicación 1.

[0011] Proporcionar al menos dos pasajes en una cáscara de huevo de un huevo para permitir la entrada en un interior del huevo y la salida del interior del huevo de ondas electromagnéticas permite distribuir la cantidad requerida de ondas electromagnéticas entre más pasajes. Por lo tanto, los pasajes pueden ser más pequeños y el daño y perjuicio al huevo y al embrión es limitado, lo que es crucial para un huevo fertilizado delicado en un entorno industrial.

[0012] En una forma de realización, la espectroscopia es espectroscopia láser. Aunque es concebible cada onda adecuada para espectroscopia, el uso de un láser para espectroscopia tiene beneficios bien conocidos.

[0013] En una forma de realización del método, el paso a) comprende proporcionar pasajes en lados opuestos del huevo. Proporcionar pasajes en lados opuestos del huevo permite aumentar la interacción entre el embrión y/o el vaso sanguíneo en el interior del huevo y las ondas electromagnéticas. Esto es particularmente relevante en el caso de espectroscopia de transmisión y absorción.

[0014] En una forma de realización del método, el paso a) comprende proporcionar pasajes a una altura de un embrión situado en el huevo. Proporcionar pasajes a la altura de un embrión situado en el huevo aumenta aún más la interacción entre el embrión en el interior del huevo y las ondas electromagnéticas.

[0015] Según la presente invención, el paso a) se realiza usando procesamiento láser, y al menos un pasaje de los varios pasajes tiene una dimensión entre 0,01 mm y 0,5 mm, en particular entre 0,01 mm y 0,05 mm. Estos pasajes pequeños también tienen beneficios en relación con la dispersión. El procesamiento láser es adecuado en particular para hacer un pequeño pasaje en la cáscara del huevo. La dimensión es generalmente un diámetro del pasaje. El pequeño diámetro del pasaje también permite usar capacidades de autocierre del huevo con respecto al pasaje, de modo que el riesgo de dañar el embrión se reduce aún más. El pasaje puede tener una forma cilíndrica, sin embargo, también es concebible una forma cónica.

[0016] En una forma de realización del método, se retira una cáscara calcárea externa mediante el procesamiento láser para proporcionar al menos un pasaje de los varios pasajes mientras se mantiene una membrana de huevo adyacente a la cáscara calcárea. Este pasaje facilita la entrada de las ondas electromagnéticas en el interior del huevo pero, sin embargo, todavía cierra el interior del huevo por la membrana interior. Por lo tanto, el riesgo de dañar el embrión se reduce aún más.

[0017] En una forma de realización del método, el paso c) comprende detectar ondas electromagnéticas que salen del huevo en al menos dos pasajes de los varios pasajes. Esto aumenta la cantidad de ondas electromagnéticas detectadas a la vez que evita la necesidad de una gran abertura que normalmente es requerida para esa cantidad. Se entenderá que las ondas electromagnéticas detectadas se usan como entrada para la espectroscopia.

[0018] En una forma de realización del método, el paso c) comprende detectar individualmente ondas electromagnéticas que salen del huevo en cada uno de los al menos dos pasajes de los varios pasajes. La detección individual en cada uno de los dos, o incluso todos, los pasajes permite crear una redundancia y mejorar la detección.

[0019] En una forma de realización, el método comprende además proporcionar los varios pasajes con un patrón que define su distribución espacial sobre la cáscara de huevo.

[0020] Un dispositivo de prueba configurado para realizar el método de cualquier reivindicación anterior se proporciona como un ejemplo fuera del alcance de la presente invención.

[0021] También se proporciona un método fuera del alcance de la presente invención y para análisis espectroscópicos *in ovo* de huevos de aves fertilizados e incubados que comprende los pasos de:

- formar un pasaje en una cáscara de huevo de un huevo,
- detectar un vaso sanguíneo en el interior del huevo,
- proporcionar un pasaje en el vaso sanguíneo,
- expulsar una cantidad de sangre del vaso sanguíneo;
- someter la cantidad de sangre a espectroscopia.

[0022] La realización de espectroscopia directamente sobre la cantidad de sangre reduce la cantidad requerida de ondas electromagnéticas y, por lo tanto, los pasajes pueden ser incluso más pequeños y el daño y perjuicio al huevo y al embrión es limitado, lo que es crucial para un huevo fertilizado delicado en un entorno industrial.

5 [0023] El pasaje se forma o proporciona en un vaso sanguíneo que forma parte de, o está altamente integrado con, una membrana en el interior del huevo, más precisamente, la membrana corioalantoica.

[0024] En un ejemplo del método, proporcionar un pasaje en el vaso sanguíneo se realiza cortando con láser el vaso sanguíneo a través del pasaje en la cáscara de huevo. Esto permite usar procesamiento láser tanto para
10 formar un paso en la cáscara de huevo como para el paso en el vaso sanguíneo.

[0025] En un ejemplo del método, los pasos de

- expulsar una cantidad de sangre del vaso sanguíneo; y
- 15 – someter la cantidad de sangre a la espectroscopia

se realizan en el interior del huevo. Esto facilita someter la sangre más directamente a la espectroscopia. Realizado en el interior del huevo significa que al menos la interacción entre la cantidad de sangre y las ondas electromagnéticas usadas para la espectroscopia se produce en el interior del huevo.

20 [0026] En un ejemplo, el método comprende

- donde expulsar una cantidad de sangre del vaso sanguíneo comprende expulsar una cantidad de sangre del vaso sanguíneo a un exterior del huevo; y
- 25 – donde someter la cantidad de sangre a espectroscopia comprende someter la cantidad de sangre a espectroscopia en el exterior del huevo. Esto facilita aún más someter la sangre más directamente a espectroscopia.

[0027] Aunque la cantidad de sangre se analiza "ex ovo", el método puede considerarse todavía un método "in ovo" porque el embrión está todavía "in ovo".

[0028] En un ejemplo del método, la expulsión de la cantidad de sangre del vaso sanguíneo y a través del pasaje al exterior del huevo comprende;

- 35 – un fluido que acopla un interior del huevo a una fuente de presión,
- controlar la presión en el interior del huevo por la fuente de presión,
- expulsar la cantidad de sangre del interior del huevo al exterior del huevo como resultado de la presión en el interior del huevo. Esto facilita la expulsión de la cantidad de sangre al exterior del huevo.

40 [0029] En un ejemplo del método, la espectroscopia comprende espectroscopia láser. Aunque es concebible cada onda adecuada para espectroscopia, el uso de un láser para espectroscopia tiene beneficios bien conocidos.

45 [0030] En un ejemplo del método, los análisis comprenden la determinación del sexo de huevos de aves fertilizados e incubados.

Breve descripción de los dibujos

50 [0031] La presente invención se describirá con más detalle a continuación, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que

La figura 1 es una vista lateral en sección transversal de un huevo sometido al método según la invención;

La figura 2 es una vista lateral en sección transversal de un huevo sometido a otra forma de realización del método según la invención,

55 Las figuras 3A-C muestran diferentes vistas laterales en sección transversal de un huevo sometido a un método fuera del alcance de la invención,

La figura 4 es una vista lateral en sección transversal de un huevo sometido a otro ejemplo del método de las figuras 3A-C.

60 Descripción de formas de realización

[0032] La figura 1 es una vista lateral en sección transversal de un huevo 1 sometido al método según la invención. El huevo de ave 1 se fertiliza y se incuba durante un cierto periodo de tiempo. El huevo 1 sostiene por lo tanto un embrión de pollo 7 en un cierto grado de desarrollo. Para determinar el sexo del embrión de pollo 7, el

huevo 1 se somete a un método para la determinación espectroscópica del sexo *in ovo* de huevos de aves fertilizados e incubados.

[0033] El método comprende el paso de proporcionar un número de pasajes 1a, 1b en una cáscara de huevo 2 del huevo 1. La provisión o formación de dicho pasaje 1a, 1b se realiza usando procesamiento láser. Por lo tanto, el pasaje 1a, 1b puede tener un diámetro pequeño entre 0,01 mm y 0,5 mm, en particular entre 0,01 mm y 0,05 mm. Los pasajes 1a, 1b permiten la entrada de ondas electromagnéticas en forma de un haz láser en un interior 4 del huevo 1 así como la salida del interior 4 del huevo 1. Los orificios 1b se abren en la llamada celda de aire 3 del huevo 1. Los orificios 1a desembocan en el interior principal 4 del huevo 1 donde se sitúa el embrión 7. El huevo comprende pasajes 1a, 1b en lados opuestos del huevo 1. En este caso, el huevo 1 comprende los pasajes 1a, 1b en lados opuestos del huevo 1 en el eje central 14 del huevo 1.

[0034] El huevo comprende los pasajes 1a, 1b a la altura del embrión 7 situado en el huevo 1. En este caso, estos pasajes 1a, 1b se proporcionan en el lado romo del huevo 1. Los pasajes 1a, 1b se proporcionan según un patrón que define su distribución espacial sobre la cáscara de huevo.

[0035] El método comprende el paso de introducir el haz láser en el interior 4 del huevo 1 a través, aquí un orificio 1a. El haz láser 5 introducido en el interior 4 interactúa con el embrión 7. La interacción entre el haz láser y el embrión 7 da como resultado una característica detectable. La interacción puede consistir en transmisión, absorción, reflexión o cualquier otra interacción adecuada. La característica detectable se determina por espectroscopia sobre el haz láser que sale del interior 4 del huevo 1 en los orificios 1a, 1b. En este caso, el haz láser 6 sale por varios orificios 1a, 1b. El haz láser 6 puede detectarse individualmente en dos o más pasajes. Alternativamente, se puede usar un detector conjunto para detectar los haces láser que salen de los pasajes 1a, 1b. El análisis de la luz, aquí la luz láser, por espectroscopia se conoce *per se* y, por lo tanto, no se describe en esta solicitud. Basándose en la característica determinada, se determina el sexo del embrión de pollo 7. La determinación implica comparar una característica con una respuesta de referencia conocida a la luz láser de un embrión con un sexo definido para determinar el sexo del embrión de pollo 7.

[0036] La figura 2 es una vista lateral en sección transversal de un huevo 1 sometido a otra forma de realización del método según la invención. Se describe la diferencia con la forma de realización de la figura 1. El huevo 1 tiene un pasaje 1a que permite la entrada de ondas electromagnéticas en forma de un haz láser en un interior 4 del huevo 1. El huevo 1 tiene otros pasajes 1a que permiten la salida de ondas electromagnéticas en forma de un haz láser desde el interior 4 del huevo 1. Una fuente láser 8 emite el haz láser 5 a través del pasaje 1a al interior 4 del huevo 1. Un detector 9 recibe el haz láser 6a que sale del pasaje 1a para proporcionar datos para análisis espectroscópicos. Aquí, el detector 9 detecta individualmente ondas electromagnéticas que salen del huevo en los pasajes individuales 1a.

[0037] Las figuras 3A-C muestran diferentes vistas laterales en sección transversal de un huevo 1 sometido a un método que forma un ejemplo fuera del alcance de la invención.

[0038] El huevo de ave 1 se fertiliza y se incuba durante un cierto periodo de tiempo. El huevo 1 sostiene por lo tanto un embrión de pollo, que no se muestra en este documento, en un cierto grado de desarrollo. Para analizar el embrión de pollo 7, el huevo 1 se somete a un método para análisis espectroscópicos *in ovo* que pueden incluir determinación de sexo de huevos de aves fertilizados e incubados. El método para análisis espectroscópicos *in ovo* de huevos de aves fertilizados e incubados que comprende el paso de proporcionar un pasaje 1a en la cáscara de huevo del huevo 1. En el interior 4 del huevo 1 se detecta un vaso sanguíneo 10. El vaso sanguíneo 10 se muestra muy esquemáticamente con fines ilustrativos. En realidad, el vaso sanguíneo 10 es parte de, o está altamente integrado con una membrana en el interior 4 del huevo 1. La membrana, que se denomina generalmente "membrana corioalantoica" no se muestra en el presente documento. El vaso sanguíneo 10 puede detectarse por cualquier medio adecuado, como un medio de obtención de imágenes. Después de que se detecta el vaso sanguíneo 10, se forma o proporciona un pasaje 11. Aquí, el pasaje 11 en el vaso sanguíneo 10 se forma cortando con láser el vaso sanguíneo a través del pasaje 1a en la cáscara de huevo 2. Después de que se forma el paso 11 en el vaso sanguíneo 10, se expulsa una cantidad de sangre del vaso sanguíneo. Por lo tanto, la sangre es más libremente accesible para análisis como la espectroscopia.

[0039] Aquí, la cantidad de sangre se somete a espectroscopia, en este caso espectroscopia láser, en el interior 4 del huevo 1 como se muestra en la figura 3C y se describe en relación con 2. Por lo tanto, la cantidad de sangre es expulsada desde el vaso sanguíneo 11 al interior 4 del huevo 1 y luego la cantidad de sangre es sometida a espectroscopia en el interior 4 del huevo 1. En otras palabras, ambos pasos de expulsión y espectroscopia en breve se realizan en el interior 4 del huevo 1.

[0040] La Fig. 4 es una vista lateral en sección transversal de un huevo 1 sometido a otro ejemplo del método de las Fig. 3A-C, que es el método para la determinación espectroscópica de análisis *in ovo* de huevos de aves 1 fertilizados e incubados. Los análisis pueden comprender la determinación del sexo de huevos de aves 1 fertilizados e incubados. El método comprende expulsar una cantidad de sangre del vaso sanguíneo 10 mostrado en la figura 3C, al exterior del huevo 1. Después de expulsar la cantidad de sangre 12 del vaso

5 sanguíneo 10 mostrado en la figura 3C, al exterior del huevo 1, la cantidad de sangre 12 se somete a espectroscopia en el exterior del huevo 1. Aquí, la expulsión de la cantidad de sangre 12 del vaso sanguíneo y a través del pasaje 1a al exterior del huevo 1 comprende acoplar fluidamente un interior 4 del huevo 1 a una fuente de presión. La fuente de presión es una copa de presión 13 que está conectada en el lado romo del huevo donde está situada la celda de aire 3 del huevo 1. La cáscara 2 del huevo 1 es permeable en la celda de aire 3 y, por lo tanto, es posible controlar la presión en el interior 4 del huevo 1 por la fuente de presión. La expulsión de la cantidad de sangre 12 desde el interior 4 del huevo 1 al exterior del huevo 1 se facilita como resultado de la presión controlada en el interior 4 del huevo 1.

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación espectroscópica del sexo *in ovo* de huevos de aves fertilizados e incubados (1) que comprende los pasos de:
 - a. proporcionar al menos dos pasajes (1a, 1b) en una cáscara de huevo (2) de un huevo para permitir la entrada en un interior (4) del huevo y la salida del interior del huevo de ondas electromagnéticas adecuadas para espectroscopia, realizándose el paso usando procesamiento láser, y teniendo los al menos dos pasajes una dimensión entre 0,01 mm y 0,5 mm,
 - b. introducir ondas electromagnéticas en el interior del huevo en un pasaje (1a) de los al menos dos pasajes (1a, 1b),
 - c. detectar ondas electromagnéticas que salen del huevo en el otro pasaje (1b) de los al menos dos pasajes (1a, 1b),
 - d. analizar por espectroscopia las ondas electromagnéticas de salida en dicho otro pasaje de los al menos dos pasajes, donde un detector (9) recibe las ondas electromagnéticas de salida en dicho otro pasaje para proporcionar datos para análisis espectroscópicos; y
 - e. determinar el sexo de un embrión de pollo (7) basándose en el paso d).
2. Método según una reivindicación anterior, donde la espectroscopia es una espectroscopia láser (6a).
3. Método según una reivindicación anterior, donde el paso a) comprende proporcionar pasajes (1a, 1b) en lados opuestos del huevo.
4. Método según una reivindicación anterior, donde el paso a) comprende proporcionar pasajes (1a, 1b) a una altura de un embrión situado en el huevo.
5. Método según una reivindicación anterior, donde al menos un pasaje de los al menos dos pasajes (1a, 1b) tiene una dimensión comprendida entre 0,01 mm y 0,05 mm.
6. Método según una reivindicación anterior, donde se retira una cáscara calcárea externa mediante el procesamiento láser para proporcionar al menos un pasaje de los al menos dos pasajes (1a, 1b) mientras se mantiene una membrana de huevo adyacente a la cáscara calcárea.
7. Método según una reivindicación anterior, donde el paso c) comprende detectar ondas electromagnéticas que salen del huevo en al menos dos pasajes de los al menos dos pasajes (1a, 1b).
8. Método según la reivindicación 7, donde el paso c) comprende detectar individualmente ondas electromagnéticas que salen del huevo en cada uno de los al menos dos pasajes (1a, 1b).
9. Método según una reivindicación anterior, y que comprende además proporcionar los al menos dos pasajes (1a, 1b) con un patrón que define su distribución espacial sobre la cáscara de huevo.

Fig. 1

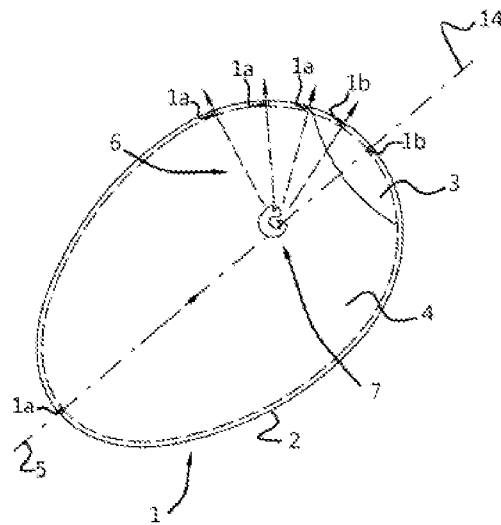


Fig. 2

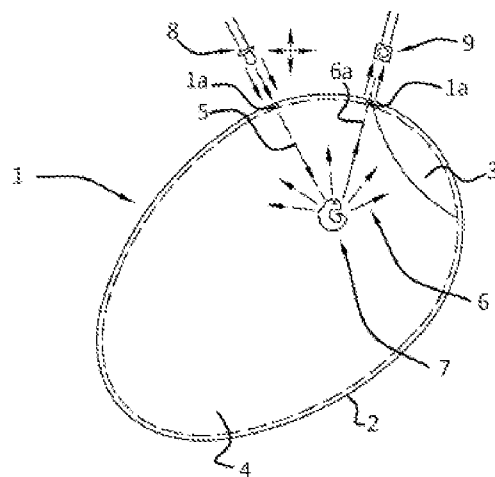


Fig. 3A

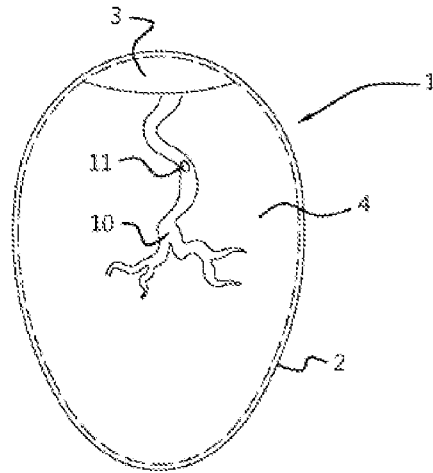


Fig. 3B

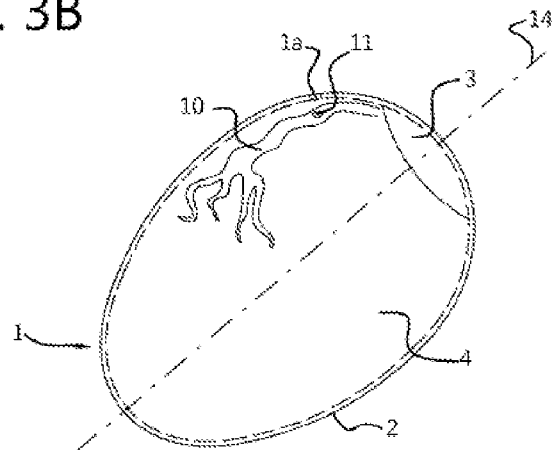


Fig. 3C

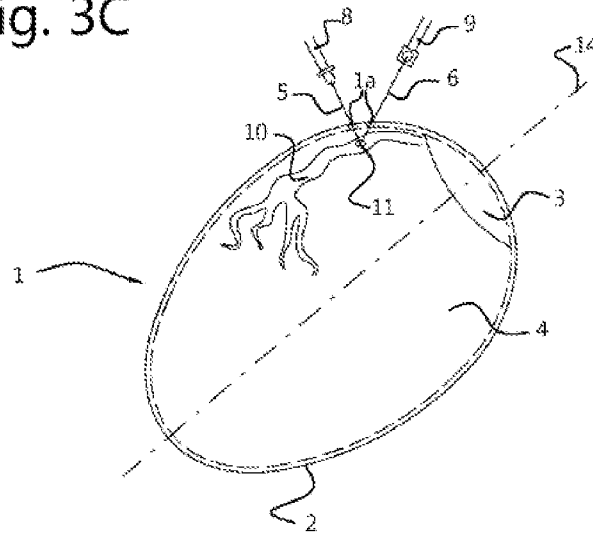


Fig. 4

