

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Januar 2016 (07.01.2016)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2016/000678 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 21/65 (2006.01) *G01N 33/08* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2015/000342
- (22) Internationales Anmeldedatum:
3. Juli 2015 (03.07.2015)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2014 010 150.9 4. Juli 2014 (04.07.2014) DE
- (71) Anmelder: TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN [DE/DE]; Helmholtzstrasse 10, 01069 Dresden (DE). UNIVERSITÄT LEIPZIG [DE/DE]; Ritterstrasse 26, 04109 Leipzig (DE).
- (72) Erfinder: GALLI, Roberta; Borsbergstrasse 19 B, 01309 Dresden (DE). PREUSSE, Grit; Humboldtstrasse 3, 01445 Radebeul (DE). KOCH, Edmund; Lene-Glatzer-

Strasse 12 b, 01307 Dresden (DE). STEINER, Gerald; Clara-Zetkin-Strasse 80, 08340 Schwarzenberg (DE). KRAUTWALD-JUNGHANNS, Maria-Elisabeth; Buchenweg 4, 04416 Markleeberg (DE). BARTELS, Thomas; Im Winkel 6, 30989 Gehrden (DE).

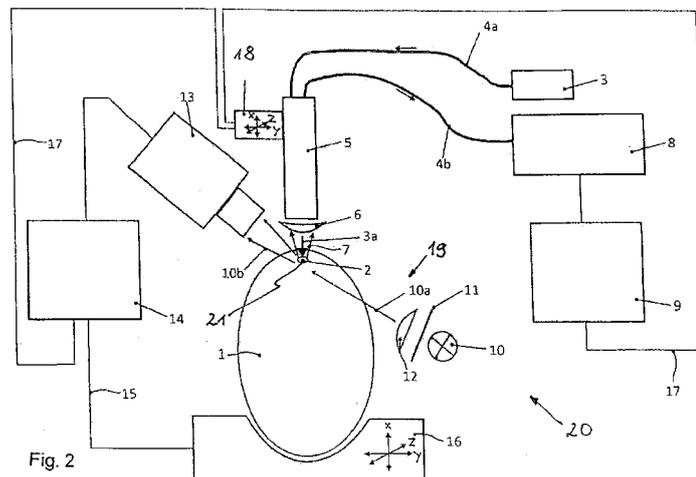
(74) Anwalt: HEMPEL, Hartmut; Jagdweg 10, 01159 Dresden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE RAMAN SPECTROSCOPIC, IN OVO SEX DETERMINATION OF FERTILISED AND HATCHED BIRDS' EGGS

(54) Bezeichnung : VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR RAMANSPEKTROSKOPISCHEN IN-OVO GESCHLECHTSBESTIMMUNG VON BEFRUCHTETEN UND BEBRÜTETEN VOGELEIERN



(57) Abstract: The invention relates to a method for the Raman spectroscopic, in ovo sex determination of fertilised and hatched birds' eggs (1), wherein the embryo, including the extra-embryonic structures, can move in the egg, and is not yet attached to the shell at the time of measuring. In addition, the following steps are carried out: monitoring the time course of the hatched egg until forming at least one recognisable blood vessel (21); creating a hole (2) in the shell in the region near to the attached bloody vessel, using a hole-generating unit; finding the blood vessel forming in the egg, using a vision system (19, 13) and a coaxial or lateral illumination with light (10a) in the visible wavelength range; positioning at least one blood vessel in the laser focus of a laser source (3), either by moving the egg or moving a lens (6) of a device (5) for introducing the laser light (3a), and detecting the Raman scattered radiation (7); registering the Raman scattered radiation of the irradiated blood vessel using the device for introducing the laser light, and for detecting the Raman scattered radiation, wherein, during the measuring process, a movement of the blood vessel out of the focus can be avoided by tracking using the vision system; evaluating the Raman scattered radiation in an evaluation unit; determining and displaying the sex of the embryo in the bird's egg.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2016/000678 A1



- (84) Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
 - vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Ramanspektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestimmung von befruchteten und bebrüteten Vogeleiern (1), wobei der Embryo einschließlich der extraembryonalen Strukturen beweglich im Ei ist, und zum Zeitpunkt einer Messung noch nicht an der Kalkschale fixiert ist. Dabei werden folgende Schritte durchgeführt: - Überwachung des Zeitverlaufs des Bebrütens bis zur Ausbildung mindestens eines erkennbaren Blutgefäßes (21), - Schaffung eines Lochs (2) in der Kalkschale im Nahbereich des fixierten Blutgefäßes mittels einer Locherzeugungseinheit; - Suchen der sich im Ei ausbildenden Blutgefäße mittels eines Visions-Systems (19, 13) und einer koaxialen oder lateralen Beleuchtung mit Licht (10a) des sichtbaren Wellenlängenbereiches, - Positionieren zumindest eines Blutgefäßes in den Laserfokus einer Laserquelle (3) entweder durch Bewegen des Eis oder Bewegen eines Objektivs (6) einer Vorrichtung (5) zur Einbringung des Laserlichts (3a) und Erfassung der Ramanstreustrahlung (7), - Registrieren der Ramanstreustrahlung des bestrahlten Blutgefäßes mittels der Vorrichtung zur Einbringung des Laserlichts und zur Erfassung der Ramanstreustrahlung, wobei während der Messung eine Bewegung des Blutgefäßes aus dem Fokus heraus durch Nachführung mittels des Visions-Systems vermieden werden kann, - Auswertung der Ramanstreustrahlung in einer Auswerteeinheit, - Bestimmung und Anzeige des Geschlechtes des Embryos im Vogelei.

5

10

15 **Verfahren und Vorrichtung zur Ramanspektroskopischen in-ovo
Geschlechtsbestimmung von befruchteten und bebrüteten Vogeleiern**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Ra-
manspektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestimmung von befruchteten und
20 bebrüteten Vogeleiern.

In der Druckschrift DE 10 2010 006 161 B3 sind ein Verfahren und eine Vorrich-
tung zur Bestimmung des Geschlechts von befruchteten und nicht bebrüteten
Vogeleiern beschrieben, wobei ein Ei zumindest eine feste Kalkschale, ein von
25 der Kalkschale und weiteren Eihüllen umgebenes Eidotter und eine dem Eidotter
zugeordnete Keimscheibe enthält, wobei eine Sonde zur Messung eines Spek-
trums durch ein Loch der Kalkschale hindurch in Richtung zur Keimscheibe mit
Keimscheibenzellen geführt wird,

wobei das Verfahren folgende Schritte aufweist:

- 30 - Positionierung der Sonde im Bereich der Keimscheibe,
- spektroskopische in-ovo Charakterisierung der Keimscheibenzellen,
- Erkennung des Geschlechts durch eine automatische Klassifizierung der re-
flektiven Spektren,

wobei als Sonde ein optischer Kristall eingesetzt wird, mit dem eine schnelle und rückwirkungsfreie Aufnahme eines Infrarot- und/oder Nahinfrarotspektrums bei Nutzung der abgeschwächten Totalreflexion innerhalb des optischen Kristalls durch das evaneszente Feld im Bereich der Keimscheibe durchgeführt wird,
5 wobei die Extinktion infolge einer spektralen Absorption von geschlechtsspezifischen Keimscheibenzellen erfolgt,
wobei die Positionierung des optischen Kristalls durch eine permanente automatische Auswertung der rückgeführten Spektren bis zur Bestimmung von geschlechtsspezifischen Keimscheibenzellen begleitet wird, bis das Spektrum aus-
10 gewertet und das Geschlecht des befruchteten Eies eindeutig angezeigt wird.

Während des Positionierungsvorgangs werden permanent rückgeführte IR- und/oder NIR-Spektren aufgezeichnet und einer Auswertung zugeführt, wobei eine automatische Klassifizierung der Spektren anhand des spektralen Fingerab-
15 druckes zum Beispiel in Proteinen, Lipiden und Nucleinsäuren erfolgt.

Bei der geschlechtsspezifischen Absorption des einfallenden IR- und/oder NIR-Lichts werden die Keimscheibenzellen anhand von Absorptionsbanden der Nucleinsäuren (DNA und RNA) sowie weiterer biochemischer Verbindungen derart
20 identifiziert, dass das Geschlecht des geprüften Eies bestimmt und angezeigt wird.

Die Messung kann mit einer herkömmlichen Infrarot-Spektroskopie durchgeführt werden.
25

Die in der Druckschrift DE 10 2010 006 161 B3 beschriebene zugehörige Vorrichtung enthält

- mindestens eine Eipositions-Auflage zur Arretierung mindestens eines Eies,
- mindestens eine Höhenverstelleinrichtung mit mindestens einem Haltearm,
- 30 - mindestens einen als Sonde ausgebildeten optischen Kristall, der an dem Haltearm befestigt ist,
- mindestens eine Steuereinheit für die eiarretierende Eipositions-Auflage und für die Höhenverstelleinrichtung,

- mindestens eine auf mindestens einen Wellenlängenbereich bezogene spektrale Lichtquelle, die einen IR- und/oder NIR-Lichtstrahl aussendet,
- mindestens einen Detektor zur Aufnahme des rückgeführten IR- und/oder NIR-Lichtstrahls,
- 5 - mindestens ein optisches Element zur geführten Strahlführung zwischen der Lichtquelle und dem optischen Kristall und zur rückgeführten Strahlführung vom optischen Kristall hin zum Detektor, sowie
 - eine mit dem Detektor verbundene Auswerteeinheit und eine Anzeigeeinheit, wobei mit der Höhenverstelleinrichtung die Höhe des Haltearms und somit des optischen Kristalls in Bezug auf den Ort der Keimscheibe einstellbar ist und der optischen Kristall im Bereich der Keimscheibe in einer Scheibenzuordnungsposition positionierbar ist, in der über den optischen Kristall ein sich bei Totalreflexion an der zur Keimscheibe gerichteten Ausgangsfläche ausbildendes evaneszentes Feld auf die Keimscheibe übergreift und die darin befindlichen Keimscheibenzellen wechselwirkend mit dem evaneszenten Feld eine geschlechtsspezifische Absorption des Licht aus dem einfallenden Strahlengang vornehmen, wobei das an der Ausgangsfläche totalreflektierte Licht über den rückgeführten Strahlengang innerhalb des Kristalls und schließlich über das optische Element zur Registrierung zum Detektor geführt ist, von dem aus die registrierten spektralen Signale zur Auswertung und Anzeige des Geschlechts übermittelt werden.

In der Druckschrift DE 10 2007 013 107 A1 wird ein DNA relevantes Zellmaterial durch Schwingungsspektroskopie analysiert, um das Geschlecht von Vogeleiern anhand von DNA-Unterschieden zu bestimmen: Entweder im Ei nach Öffnung mit einer Sonde oder nach Entnahme des Materials aus dem Ei und Deposition auf einem Substrat. Die UV-Resonanzraman-Spektroskopie wird bei Wellenlängen von 244 nm oder 254 nm festgelegt. Dabei wird eine Spektrenklassifikation mit allen existierenden überwachten und nichtüberwachten Verfahren durchgeführt:

- mit einem DNA-relevanten Material, mit speziellem Bezug zur Federpulpa und der Keimscheibe und
- einer UV-Raman-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 244 nm oder 257 nm.

Bei diesem Verfahren wird somit DNA-relevantes Zellmaterial des geschlechtlich zu bestimmenden Vogels mit Licht untersucht und die Molekülschwingungen gemessen, wobei das durch das Licht entstehende Spektrum der Molekülschwingungen erfasst und mit vorgegebenen sowie geschlechtsspezifische DNA-Strukturen der zu untersuchenden Vogelart repräsentierenden Referenzspektren verglichen wird und wobei aus diesem Spektralvergleich eine auf Grundlage des DNA-Gehalts des Zellmaterials basierende Geschlechtszuordnung des Vogels getroffen wird.

Die Molekülschwingungen werden dabei mittels Anwendung der Raman-Spektroskopie oder der IR-Spektroskopie gemessen, wobei z.B. das DNA-relevante Zellmaterial aus dem Schaft einer jungen Feder eines Vogels entnommen werden kann. Das Zellmaterial wird auf einem Träger präpariert und mit Licht abgetastet.

In einem anderen in der Druckschrift DE 10 2007 013 107 A1 beschriebenen Teilverfahren wird das Licht zur Messung der Molekülschwingungen des DNA-relevanten Zellmaterials von ungeschlüpften Vögeln durch die Eierschale hindurch auf den Embryo oder die Keimscheibe fokussiert, wobei das Spektrum der durch die Molekülschwingungen entstehenden Strahlung im Ei mit einer durch dessen Schale hindurch geführten Sonde gemessen wird.

Für die Hindurchführung der Sonde wird zur Messung des Spektrums wenigstens ein mikroskopisch kleines Loch durch die Eischale hindurch gebohrt. Das Licht wird durch den kleinen Zugang durch die Eischale unmittelbar auf die Keimscheibe als Zellmaterial fokussiert. Durch den gleichen oder einen anderen Zugang geringer Öffnungsgröße wird die Sonde eingeführt, mittels der das reflektierte und von der Sonde aufgenommene Spektrum der vorgenannten Molekülbewegung im Innern des Eis gemessen wird.

Die erhaltenen spektralen Informationen werden in einem zweiten Schritt mit geschlechtsspezifischen Referenzdaten verglichen und einem Klassifizierungsalgorithmus zugeführt. Diese repräsentieren vorzugsweise statistisch gewonnene Daten über die zu untersuchenden Vogelart. Aus diesem Vergleich wird die Geschlechtszuordnung des zu untersuchenden DNA-Materials getroffen.

Ein Problem besteht darin, dass für die Einbringung einer Sonde in vorgefertigte Löcher bei einer sehr großen Anzahl von zu untersuchenden Vogeleiern ein großer zeitlicher Aufwand erforderlich ist. Außerdem muss bei einer Fokussierung des Lichts aus der Sonde auf die Keimscheibe ein erheblicher Justierungsaufwand für eine optische Abbildung in Bezug auf den Ort der Keimscheibe betrieben werden, wobei von Ei zu Ei die Fokussierungsebene eine andere Lage aufweisen kann und damit keine Bestimmung des Geschlechts durchgeführt werden kann.

10

Problematisch an diesen Untersuchungen ist weiterhin, dass das zur Untersuchung der Keimscheiben notwendige Einbringen der Löcher in die Kalkschale einschließlich der Eischalenmembran am Tag „Null“ zu einer Beeinträchtigung der Emryonalentwicklung und zu stark sinkenden Schlupfraten führt, wie in den Druckschriften S. Klein: Analysis of chicken embryonic development after removal of blastodermal cells for sexing. British Poultry Science (39), 1998, S. 482-487; einschließlich darin zitierter Literatur: J. Brake, T. W. (1997). Egg handling and storage. Poultry science (76), S. 144-151 beschrieben ist.

20 In der Druckschrift WO 2014/021715 A2 wird eine Geschlechtsbestimmung von Vogelembryonen beschrieben, wobei das Verfahren durchgeführt wird mittels

- a) Detektion einer Markerverbindung von Zuckern und Aminosäuren, Vorstufen und Metaboliten in der Allantoisflüssigkeit des Eies am 8.-11. Bruttag,
- b) Quantitative Bestimmung des Markers mittels NMR-Spektroskopie,
- 25 c) Geschlechtsbestimmung durch Vergleich der Menge des Markers zu einem vorgegebenen Ausgangswert.

Dabei erfolgt eine

- Bestimmung der absoluten Mengen oder von Mengenverhältnissen von Verbindungen (Glukose, Cholin, Valin), um sie mit einem Basiswert zu vergleichen,

30

- Anwendung von unsupervised chemometrischen Verfahren (wie least-square modeling oder PCA) auf quantitative Mengen oder Mengenverhältnissen zur Geschlechtsbestimmung.

Ein wesentlicher Nachteil des Verfahrens besteht darin, dass eine Entnahme
5 mindestens einer Probe aus dem Ei erfolgt.

In den Druckschriften US 8 364 247 B2 und EP 2 336 751 A1 wird ein Verfahren zur Bestimmung des Geschlechts an Vogeleiern beschrieben, bei dem mit einer Strahlungsquelle elektromagnetische Strahlung auf die Keimscheibe eines Eies
10 emittiert und nach dem Abschalten der Strahlungsquelle am bestrahlten Bereich der Keimscheibe das Abklingverhalten der angeregten Eigenfluoreszenzintensität zeit- und spektral aufgelöst für mindestens eine Wellenlänge der Eigenfluoreszenz mit einem Detektor erfasst wird. Mit den ermittelten Intensitätsmesswerten wird die fraktale Dimension berechnet und der Wert der fraktalen Dimension DF mit
15 einem art- und geschlechtsspezifischen Grenzwert verglichen; wobei bei Überschreiten des Grenzwertes das jeweilige Ei als weiblich und bei Unterschreiten als männlich eingestuft wird.

Die Ei-Öffnung am Tag „Null“ führt zu stark reduzierten Schlupfraten. Es besteht weiterhin eine mögliche irreparable Schädigung der Keimscheibe durch die ein-
20 gesetzte UV-Strahlung bei 337nm.

In der Druckschrift US 7 950 349 B1 wird ein Verfahren zur Bestimmung:

- 1) der Fruchtbarkeit eines Vogeleies durch Messung der Lumineszenz und der Biophotonenintensität (Photonen pro Sekunde) des Eies nach Einwirkung einer
25 externen Lichtquelle und
- 2) des Geschlechtes eines Vogeleies durch Messen des Photonenspektrums der Biophotonenemission und Lumineszenz des Eies nach Einwirkung einer externen Lichtquelle
beschrieben.

30 Dabei kann die externe Lichtquelle entweder eine Glühlampe, Leuchtstofflampe, LED oder eine (gepulste oder CW) monochromatische oder dichromatische Laserlichtquelle sein. Der erste Teil des Verfahrens ergibt sich aus der Tatsache, dass nach Exposition mit der Lichtquelle, die fruchtbaren Vogeleier eine höhere

Intensität der Photonen als die der unbefruchteten Vogeleier emittieren. Der zweite Teil des Verfahrens ergibt sich aus der Tatsache, dass nach Exposition mit den genannten Lichtquellen, Vogeleier des weiblichen Geschlechts ein anderes Spektrum von Photonen als Vogeleier des männlichen Geschlechts emittieren.

5

In den Druckschriften WO 2010/103111 A1 und US 2012/0058052 A1 werden ein nicht-invasives Verfahren und eine Vorrichtung zur in-ovo-Bestimmung des Geschlechts von Vogelarten beschrieben. Das Verfahren umfasst die Schritte der Einführung eines markierten Antikörpers in das Ei, der sich an ein geschlechtsspezifisches Antigen des Embryos anbindet, und die Detektion des markierten gebundenen Antikörpers mit einer Erfassungseinrichtung außerhalb des Eies.

10

In der Druckschrift US 7 041 439 B2 werden ein Verfahren und eine Vorrichtung für die automatisierte Prozessführung von Eiern nach ausgewählten Charakteristika (z.B. des Geschlechtes) beschrieben, wobei folgende Schritte ablaufen:

15

a) Extraktion von Probenmaterial (Allantoisflüssigkeit, Eiweiß, Eigelb, Eischale, Albumin, Gewebe, Membran und / oder Blut),

b) Analyse des extrahierten Materials zur Bestimmung der ausgewählten Charakteristika und

20 c) selektive Prozessführung der identifizierten Eier.

Beispielsweise wird darin ein Verfahren zur Verarbeitung von Eiern auf der Basis des Geschlechts dargestellt, welches aus folgenden Schritten besteht:

1) Identifizierung lebender Eier,

2) Extraktion von Allantoisflüssigkeit aus den als lebend identifizierten Eiern,

25 3) Ermittlung des Östrogengehaltes und einer Farbveränderung in der extrahierten Allantois-Flüssigkeit zur Geschlechterkennung,

4) selektive Injektion eines Impfstoffs in Abhängigkeit des Geschlechtes.

Ein Nachteil besteht darin, dass die Untersuchung der Allantoisflüssigkeit am Tag 13 bis 18 erfolgt. Auch hier ist eine Probenentnahme notwendig.

30

In der Druckschrift US 6 365 339 B1 ist ein Verfahren zur Geschlechtsbestimmung von Vogelembryonen beschrieben, bei dem während des Brutprozesses nach Aufbohren der Kalkschale Proben von der Allantoisflüssigkeit des Embryos

genommen und in einem Ionenmobilitätsspektrometer (IMS) analysiert werden. Die resultierenden Spektren enthalten relevante Markerpeaks, die mit geschlechtsspezifischen Mobilitäten korrelieren.

Ein Nachteil besteht darin, dass auch hier Proben entnommen werden müssen,
5 die einen höheren Aufwand zumindest im Umfeld zur Geschlechtsbestimmung bedingen.

In den Druckschriften WO 2010/150265 A3 und US 2013/0044210 A1 wird ein Verfahren zur Geschlechtsbestimmung unbebrüteter Vogeleier durch hyperspekt-
10 rale Analyse optischer Spektren (bevorzugt Reflexionsspektren) beschrieben. Die Analyse erfolgt in einem Spektralbereich mit Wellenlängen bis zu 2500 nm (MIR), um das vom CaCO₃ der Kalkschale des Eies erzeugte Signal bei 2340 nm herausfiltern zu können. Das Verfahren ermöglicht es, biologische Komponenten, andere als Blut, zu detektieren und ermöglicht sowohl die Erfassung der Frucht-
15 barkeit vor dem zweiten Bebrütungstag als auch die Bestimmung des Geschlechts der Küken im Ei am zwölften Bebrütungstag. Die Sensitivität konnte durch die Verwendung einer neuronalen Netzwerkanalyse erhöht werden. Mittels der Hauptkomponentenanalyse (PCA) werden die spektralen Merkmale bestimmt, die für die Varianzen zwischen den unbefruchteten Kontrolleiern und den
20 Probeneiern verantwortlich sind. Mittels einer neuronalen Netzwerkanalyse auf der Grundlage der PCA-Ergebnisse werden dann die kleinen, aber signifikanten Veränderungen zwischen den Kontroll- und experimentellen Eier erhalten. Die Methode ermöglicht die Bestimmung der Fruchtbarkeit mit mehr als 90% Genauigkeit am Tag „Null“ (Tag der Eiablage) und des Geschlechtes der Küken mit
25 mehr als 75% Genauigkeit am zwölften Bruttag.

Ein Nachteil besteht darin, dass mit dem Verfahren eine Geschlechtsbestimmung erst am 12. Tag durchgeführt werden kann.

In der Druckschrift US 6 029 080 B1 werden ein nichtinvasives Verfahren und
30 eine Vorrichtung zur Geschlechtsbestimmung von Vogeleiern dargestellt, bei dem mittels magnetischer Kernresonanz (NMR) bestimmt wird, ob der lebende Embryo im Ei männliche Geschlechtsorgane oder weibliche Geschlechtsorgane aufweist.

Ein Nachteil besteht darin, dass die Ausbildung der Geschlechtsorgane erst im entwickelten Embryo nach wesentlichen mehreren Tagen erfolgt, wobei zumindest die Durchführung eines hohen finanziellen Aufwandes bedarf.

5

In der Druckschrift US 6 506 570 B1 wird zur in-ovo Geschlechtsbestimmung von Vogeleiern die An- oder Abwesenheit eines erhöhten geschlechtsspezifischen Hormonspiegels, vorzugsweise des Östrogenspiegels, in einer extraembryonalen Flüssigkeit, vorzugsweise der Allantoisflüssigkeit, bestimmt. Das Verfahren wird
10 vorzugsweise auf Hühnereier angewendet und kann vor oder während der Umlagerung aus dem Vorbrüter in den Schlupfschrank durchgeführt werden.

In der Druckschrift DE 10 2012 023 947 A1 ist ein Verfahren zur Strukturaufklärung durch eine optisch undurchsichtige Barriere eines biologischen Untersuchungsobjektes hindurch beschrieben. Bei dem Untersuchungsobjekt wird eine
15 innere Struktur mit unterschiedlichen dielektrischen Eigenschaften mittels elektromagnetischer Spektralanalyse aufgeklärt,
wobei das Untersuchungsobjekt unter einem Array von Pulssendern und Empfängern, welche in einer Ebene angeordnet und daten- sowie informationsleitend
20 mit einem Computersystem verbunden sind, positioniert wird,
wobei durch die Pulssender elektromagnetischen Pulse im Spektralbereich 0,01 bis 1 THz auf das positionierte Untersuchungsobjekt ausgesendet werden,
wobei die vom Untersuchungsobjekt ausgehende Strahlung von den Empfängern aufgenommen und dem Computer über daten- sowie informationsleitende Ver-
25 bindungen für ein bildgebendes Verfahren zugeleitet wird.

Da die THz-Strahlung sehr schwach ist, treten lange Messzeiten auf, die zur Durchführung einer schnellen Geschlechtsbestimmung hinderlich sind. Außerdem erfordert eine starke Absorption von begleitendem Wasserdampf im THz-Bereich eine extrem niedrige bzw. konstante Luftfeuchtigkeit in der Brüterei, was
30 wiederum einen hohen technischen Zusatzaufwand bedeutet.

In der Druckschrift DE 20 2013 011 765 U1 ist eine spektralphotometrische Analyse der Federfarbe von Hühnerembryos beschrieben. Dabei wird elektromagnetische Energie mit einer Wellenlänge zwischen etwa 380nm und 740nm zur nicht

invasiven Bestimmung der Geschlechts von Vogelembryos verwendet, wobei ein Vogelei der elektromagnetischen Energie ausgesetzt und die Menge an Absorption, Diffusion, Refraktion, Reflexion oder einer beliebigen Kombination davon der elektromagnetischen Energie durch das Vogelei bestimmt wird. Es wird über
5 das Vorliegen oder Fehlen von Farbpigment im Inneren des Vogeleies das Geschlecht des Vogelembryos wenigstens teilweise bestimmt.

Die spektralphotometrische Analyse der Federfarbe von Hühnerembryos kann nur auf braue Rassen bzw. auf Rassen mit Farbunterschied von weiblichen Küken oder männlichen Küken angewendet werden.

10

Im Folgenden wird eine Zusammenfassung der Nachteile der Verfahren aus den genannten Druckschriften angegeben:

1. die Geschlechtsbestimmung am Tage „Null“ bedingt einen Zugang zur festgestellten Position der Keimscheibe, was nach bisherigen Erfahrungen eine
15 Beeinträchtigung der Embryonalentwicklung und stark sinkende Schlupfraten mit sich bringen.
2. bei der späten Geschlechtsbestimmung mit Inkubationstagen von 7 bis 21 Tagen spielen erstens tierschutzrechtliche Aspekte
 - wobei ab dem 7. Inkubationstag das Schmerzempfinden des Vogelembryos beginnt und
20 - wobei ein spätes Abtöten weit entwickelter Vogelembryonen durchgeführt wird, weil mit steigender Inkubation der Ei-Inhalt aus dem Vogelembryo selbst besteht,
 - und zweitens ökonomische Aspekte
- 25 - wobei bei der späten Geschlechtsbestimmung die männlichen Eier länger im Brutschrank sind, was eine weitgehend schlechtere Auslastung der Brutschränke und somit höhere Stromkosten bedingen eine wesentliche Rolle.
3. Bei einer Geschlechtsbestimmung mit einer Entnahme von Probenmaterial
30 können folgende Probleme auftreten:
 - die nach jeder Messung notwendige zusätzliche Reinigung und Desinfektion bzw. Ersatz von Geräten oder Geräteteilen (z.B. Kanülen) erhöht laufende Verbrauchskosten deutlich,

- es ergibt sich eine erschwerte Automatisierbarkeit gegenüber kontaktlosen Verfahren und
- das Infektionsrisiko wird stark erhöht, so dass sich eine Gefahr der reduzierten Schlupfraten ergeben kann.

5

Alle in den oben genannten Druckschriften beschriebenen Verfahren und Vorrichtungen zur Geschlechtsbestimmung können in die schematisch in Fig. 1 dargestellten Auswertungs-Ebenen-Bereichsdarstellung 33 innerhalb der beiden inneren geschlossenen Gebiete 30, 31 der in Fig. 1 dargestellten drei Gebiete 30, 31, 10 32 eingeordnet werden. Die bekannten Verfahren umfassen in der Ebenen-Bereichsdarstellung 33 aber nicht den Restbereich 32, auf dem sich das vorliegende erfindungsgemäße Verfahren favorisiert.

In der Druckschrift: "Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy", Andreas Volkmer, J. Phys. D: Appl. Phys. 38 (2005) R59–R81 doi:10.1088/0022-3727/38/5/R01", einschließlich 15 der darin enthaltenen Referenzen, wird die kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung Spektroskopie (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) spectroscopy) Theorie beschrieben, die zur nichtlinearen Ramanspektroskopie gehört. Mittels CARS-Spektroskopie werden die gleichen Molekülschwingungen wie bei der linearen Ramanspektroskopie untersucht. 20

Aber ein wesentlicher Unterschied zwischen der linearen und nichtlinearen Ramanspektroskopie besteht jedoch in der besonderen Anregungsart. Bei der CARS-Spektroskopie wird ein Multi-Photonen-Prozess zur Anregung der Molekülschwingungen genutzt und ein kohärentes Signal erzeugt. Im Ergebnis wird 25 mittels CARS ein Signal erhalten, welches um Größenordnungen stärker als das der spontanen Ramanemission der linearen Ramanspektroskopie ist (Faktor 10^5), was zu einer kürzeren Messzeit führt. Weiterhin ist das CARS-Signal blau verschoben und deshalb frei von Fluoreszenz.

Die Anregung erfolgt mittels ultraschneller NIR-Laser, sodass die Eindringtiefe vergleichbar mit der Eindringtiefe bei der NIR-Ramanspektroskopie ist und dadurch Lichtschäden minimiert sind. 30

Die Sensitivität wird nicht durch die Detektion der CARS-Photonen limitiert, sondern eher durch die Unterscheidung zwischen resonanten und nichtresonanten Anteilen des CARS-Signals. Verschiedene bekannte Verfahren existieren zum Separieren des resonanten Anteiles durch spezielle Konfigurationen zur Anregung/ Sammlung des Lichtes:

- Die polarisationssensitive Detektion,
- die zeitaufgelöste Detektion und
- die spektrale und räumliche Phasenkontrolle.

Alternativ kann das Ramanspektrum aus dem CARS-Spektrum durch eine modifizierte Kramers-Kronig-Transformation oder durch spezielle Rechenmethoden, basierend auf der Annahme maximaler Entropie, erhalten werden.

Verschiedene Anwendungen der Hochgeschwindigkeits-CARS-Spektroskopie sind in den Druckschriften:

- 15 „Unterscheidung biochemischer Komponentendiscrimination“ A. Dogariu, Y. Huang, Y. Avitzour, R. K. Murawski, and M. O. Scully, und
"Sensitive femtosecond CARS discrimination between 2,6 Dipicolinic acid and 3,5 Dipicolinic acid," *Opt. Lett.*, Vol. 31, No. 21, 3176 (2006);
Y. Huang, A. Soroka, K. Cohen, and A. Dogariu, und
20 "Backscattered Coherent Anti-Stokes Raman Scattering for At Range Detection of Dipicolinic Acid and Four-Wave Mixing Multiple Scattering," *J. Mod. Optics* Vol. 54, No. 16, 2473 (2007)), und
"Detektion von Bakterien" D. Pestov, X. Wang, G. O. Ariunbold, R. K. Murawski, V. A. Sautenkov, A. Dogariu, A. V. Sokolov, and M. O. Scully, und
25 "Single-shot Detection of Bacterial Endospores via Coherent Raman Spectroscopy," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105, 422 (2008); und
A. Dogariu, A. Goltsov, D. Pestov, A. V. Sokolov, and M. O. Scully, und "Real-time detection of bacterial spores using Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy," *J. Appl. Phys.* 103, 036103 (2008) und
30 die Echtzeitdetektion von Sprengstoffen in der Druckschrift
Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy for detecting explosives in real-time, Arthur Dogariu and Alex Pidwerbetsky, *Proc. of SPIE* Vol. 8358, doi: 10.1117/12.919568) beschrieben.

Das genannte Ramanspektroskopische Verfahren kann ebenso an CARS-Spektren von Blut in Echtzeitmessungen demonstriert werden. Die CARS Schwingungsspektren der roten Blutzellen können in wenigen Picolitern und Milli-
5 sekunden registriert werden, wie in folgenden Druckschriften

A. Dogariu, A. Goltsov, and M. O. Scully, "Real-time monitoring of blood using coherent anti-Stokes Raman spectroscopy," J. Biomed. Opt. 13, 54004 (2008) und Rinia HA, Bonn M, Vartiainen EM, Schaffer CB, Müller M: Spectroscopic analysis of the oxygenation state of hemoglobin using coherent anti-stokes raman
10 scattering. J. Biomed. Opt. 11(5):050502-050502-3 beschrieben ist.

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Ramanspektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestimmung von befruchteten und bebrüteten Vogeleiern anzugeben, die derart geeignet ausgebildet
15 sind, dass das Geschlecht bereits in den Eiern schnell und zuverlässig eindeutig bestimmt werden kann, wobei sich der weibliche Embryo normal weiterentwickeln und es zum Schlupf des weiblichen Kükens kommen kann.

Die Aufgabe wird durch die Merkmale der Patentansprüche 1, 5 und 30 gelöst.
20 Das Verfahren dient zur Ramanspektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestimmung von befruchteten und bebrüteten Vogeleiern, wobei der sich ausbildende Embryo einschließlich der extraembryonalen Strukturen beweglich im Ei und noch nicht an der Kalkschale fixiert ist,

wobei gemäß dem Kennzeichenteil des Patentanspruchs 1
25 folgende Schritte durchgeführt werden:

- Überwachung des Zeitverlaufs des Bebrütens bis zur Ausbildung mindestens eines erkennbaren Blutgefäßes,
- Schaffung eines Lochs in der Kalkschale zumindest im Nahbereich des fixierten Blutgefäßes mittels einer Locherzeugungseinheit mittels eines Lasers oder mittels mechanischer Perforation,
30
- Suchen der sich im Ei ausbildenden Blutgefäße mittels eines Vision-Systems und einer koaxialen oder lateralen Beleuchtung mit Licht im sichtbarem Wellenlängenbereich,

- Positionieren zumindest eines Blutgefäßes in den Laserfokus einer Laserquelle entweder durch Bewegen des Eies oder eines Objektivs,
 - Registrieren der Ramanstreustrahlung des bestrahlten Blutgefäßes, wobei während der Messung eine Bewegung des Blutgefäßes aus dem Fokus heraus durch Nachführung der Gefäße oder eines Objektivs erfolgen kann,
- 5
- Auswertung der Ramanstreustrahlung in einer Auswerteeinheit,
 - Bestimmung des Geschlechts und Anzeige des Geschlechtes des Embryos im Vogelei.
- 10
- Das Einbringen eines Loches in die Kalkschale mittels einer Locherzeugungseinheit in Form eines Lasers oder mechanischer Perforation kann am nach oben gerichteten, spitzen Pol des Eies mit Durchmessern mit bis zu 18mm, vorzugsweise zwischen 8mm und 15mm durchgeführt werden.
- 15
- Das Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich kann weißes Licht sein, jedoch wird der Kontrast verbessert bei Einsatz von blauem und/oder grünem Licht aus einer Lichtquelle.
- 20
- Während der Messung kann eine Bewegung des Blutgefäßes aus dem Fokus heraus durch Nachführung der Blutgefäße oder des zugehörigen Objektivs, ausgelöst durch das überwachende Vision-System, erfolgen.
- 25
- Ein zweites Verfahren dient zur Ramanspektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestimmung von befruchteten und bebrüteten Vogeleiern, wobei die extraembryonalen Strukturen nicht mehr frei beweglich sind, sondern eine Fixierung der Chorioallantoismembran (CAM) an der Kalkschale beginnt, wobei gemäß dem Kennzeichenteil des Patentanspruchs 5 folgende Schritte durchgeführt werden:
- Überwachung des Zeitverlaufs des Bebrütens solange, bis eine Fixierung der
- 30
- Chorioallantoismembran (CAM) an der Kalkschale beginnt und bereits Blutgefäße vorhanden sind,
 - Identifikation der Blutgefäßposition mittels Durchleuchtung mit Licht des sichtbaren Wellenlängenbereiches,

- Einbringen eines Loches in die Kalkschale zumindest im Nahbereich des fixierten Blutgefäßes mittels einer Locherzeugungseinheit in Form eines Lasers oder mechanischer Perforation,
- Positionieren der Blutgefäße in den Laserfokus einer Laserquelle entweder
5 durch Bewegen des Eies oder eines Objektivs,
- Registrieren der Ramanstreuung zumindest eines bestrahlten Blutgefäßes, wobei die Messung des Blutes in den Kapillaren oder in größeren Gefäßen innerhalb oder unterhalb der Chorioallantoismembran (CAM) durchgeführt wird,
- 10 – Auswertung der Ramanstreuung in einer Auswerteeinheit,
- Bestimmung des Geschlechtes und Anzeige des Geschlechtes des Embryos im Vogelei.

Das Licht des sichtbaren Wellenlängenbereiches kann weißes oder blaues oder
15 grünes oder blaues und grünes, Kontrast erzeugendes Licht aus einer Lichtquelle sein.

Durch das Einbringen eines Loches in die Kalkschale mittels eines Lasers oder
mittels mechanischer Perforation können Löcher mit Durchmessern mit bis zu
20 5mm, vorzugsweise zwischen 0,1mm und 3mm ausgebildet werden,

Nach den jeweiligen Messabläufen und Verfahrensschritten erfolgt in der Auswerteeinheit eine Klassifizierung zur Erkennung des Geschlechtes des jeweils ausgemessenen bebrüteten Vogeleies vor der Anzeige des Geschlechtes.
25

Damit kann die Ramanstreuung von Blut extraembryonaler Blutgefäße und/oder von Blut embryonaler Blutgefäße zur nicht invasiven in-ovo Geschlechtsbestimmung im bebrüteten Vogelei genutzt werden.

30 Folgende Parameter werden für die Ramanspektroskopie eingesetzt:

- Anregungswellenlängen des Laserlichts der Laserquelle für die Ramanspektroskopie: > 600 nm, z.B. HeNe-Laser 633 nm, Festkörperlaser (Nd basiert z.B. Nd:YAG Laser 1064nm, VIS NIR Diodenlaser z.B. 785 nm),
- 5 - Einkopplung des Laseranregungsstrahles direkt mit Spiegeln und/oder mit optischen Fasern,
- Ramanstreustrahlungsmessungen werden unter Nutzung von optischen, mit großer numerischer Apertur NA ausgebildeten Systemen wie Mikroskop-Objektiven oder einer Raman-Fasersonde durchgeführt,
- 10 - Direkte Auskopplung der gesammelten Ramanstreustrahlung mit Spiegeln zum Spektrometer oder für den Transport mit optischen Fasern,
- Anwendung von dispersiven Ramanspektrometern und Fourier Transform Raman Spektrometern.

15 Zur Bildung der genutzten Blutgefäße und der sich gebildeten Chorioallantois-membran (CAM) kann im jeweiligen Messablauf angegeben werden, dass sich die Blutgefäße ab dem zweiten Bebrütungstag bilden und bis zum dritten Bebrütungstag das embryonale Blut im Blutkreislauf zirkuliert. Das bedeutet, dass eine sofortige Geschlechtsbestimmung sehr frühzeitig etwa ab dem dritten Bruttag zweckmäßig ist.

20 Während des Positionierungsvorgangs des Vogeleies können permanent rückgeführte Ramanspektren aufgezeichnet und einer Auswertung zugeführt werden, wobei eine automatische Klassifizierung der Ramanstreustrahlung anhand des spektralen Fingerabdruckes des Blutes erfolgt.

25 Das Ei wird vorzugsweise pollastig gestellt und ein Loch kann im Bereich des nach oben gerichteten spitzen Pols bei einer Lochgröße von 10 mm und bei drei Bruttagen eingebracht werden. Etwa ab dem fünften Tag beginnt die Chorioallantoismembran an der äußeren Membran zu haften und es kann ein kleineres Loch
30 in der Kalkschale bei Bruttagen mit länger als fünf Tagen, wobei das Loch auch horizontal möglich ist, eingebracht werden.

Das Loch der Kalkschale des Eies gewährleistet den optischen Zugang zu dem erkannten blutdurchflossenen Blutgefäß.

Der Laserstrahl wird auf das ausgewählte Blutgefäß fokussiert und die Nachführung
5 mittels eines Objektivs gegebenenfalls automatisch durchgeführt.

Die eingebrachte Leistung der Laserquelle darf nicht zu einer lokalen und globalen Erwärmung des Eies über 40° Celsius führen.

10 Die Ramanstreustrahlung kann vorzugsweise mit einem Objektiv mit großer numerischer Apertur ($NA > 0,3$) registriert werden.

Die Ramanstreustrahlung kann mittels einer Raman-Fasersonde erfasst werden.

15 Die erfasste Ramanstreustrahlung kann über Faserleitungen dem Spektrometer zugeführt werden.

Für die Auswertung der Ramanbanden in der Auswerteeinheit wird vorzugsweise der Bereich von 500 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} (Raman-Verschiebung) genutzt.

20

Die geschlechtsspezifischen Merkmale sind in den Ramanbanden der Nucleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipide und Proteine enthalten, wobei die Ramanbanden einer mathematischen Analyse zugeführt werden.

25 Für die mathematische Analyse können Verfahren der gestützten und nicht gestützten Klassifizierung eingesetzt werden, wobei die geschlechtsspezifischen Merkmale einer Merkmalstabelle abgelegt sind.

Die erfasste Ramanstreustrahlung kann in der Form korrigiert werden, dass Untergrundsignale durch Fluoreszenz oder andere Streuprozesse eliminiert werden
30 und die Spektren in vorgegebener Form normiert werden.

Zur Geschlechtsbestimmung kann somit neben Blut auch die mit Kapillargefäßen durchzogene Chorioallantoismembran (CAM) herangezogen werden.

Die Geschlechtsbestimmung kann an jedem Tag zwischen dem Beginn der Bebrütung und dem Schlupf vorgenommen werden, vorzugsweise in Bezug auf die
5 Ausbildung der Blutgefäße etwa am dritten Bruttag bis zum fünften Bruttag.

Anstelle der linearen Ramanspektroskopie kann die nichtlineare Ramanspektroskopie in Form der kohärenten Anti-Stokes-Raman-Streuung-
10 Spektroskopie (CARS) genutzt werden, wobei das CARS-Spektrum vom Blut des Blutgefäßes unter Nutzung derselben Aufnahmekonfiguration wie für die spontane Ramanspektroskopie mit oder ohne Faseroptik aufgenommen wird.

Das CARS-Signal kann auch durch einen breitbandigen Femto-Sekundenlaser generiert werden, der als Pumplaser und als Stokeslaser dient.
15

Das CARS-Signal kann mittels zwei Laserquellen generiert werden, insbesondere mittels eines Breitbandlasers und eines Schmalbandlasers zur Nutzung und Auswertung einer multiplexen CARS-Spektroskopie.
20

Die CARS-Spektren können zur Klassifikation genutzt werden.

Der resonante Anteil des CARS-Spektrum [$\text{Im}(\text{Chi}^{(3)})$] kann vom nichtresonanten Anteil [$\text{Re}(\text{Chi}^{(3)})$] separiert und nur der resonante Anteil kann für die Klassifikation herangezogen werden.
25

Für die CARS-Spektroskopie kann eine gleiche Klassifikationsstrategie wie für die herkömmliche Ramanspektren durchgeführt werden.

30 Als Vogeleier kommen hauptsächlich Hühnereier in Betracht, deren Geschlecht bestimmt wird.

Die Vorrichtung zur Bestimmung der zur Ramanspektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestimmung von befruchteten und bebrüteten Vogeleiern nutzt die vorgenannten Verfahren und umfasst

gemäß dem Kennzeichenteil des Patentanspruchs 30 zumindest

- 5 - eine Ei-Lagerungseinheit,
- eine Blutgefäß-Positions-Auswerteeinrichtung, die mit der Ei-Lagerungseinheit in Verbindung steht,
- eine Strahlungseinrichtung mit Licht aus dem sichtbaren Wellenlängenbereich einer Lichtquelle zur Erkennung mindestens eines Blutgefäßes innerhalb der geöffneten Kalkschale,
- 10 - einen Detektor für das Licht zur Erkennung von Blutgefäßen, wobei der Detektor mit der Blutgefäß-Positionier-Auswerteeinrichtung in Verbindung steht, wobei die Strahlungseinrichtung und der Detektor zumindest ein Visions-System bilden,
- 15 - eine Locherzeugungseinheit zur Schaffung eines Lochs in der Kalkschale zumindest im Nahbereich des fixierten Blutgefäßes,
- eine Vorrichtung zur Einbringung von Laserlicht in die geöffnete Kalkschale, wobei die Vorrichtung zumindest in Verbindung steht mit
 - 20 - einer das Laserlicht emittierenden Laserquelle, wobei das Laserlicht auf mindestens ein Blutgefäß fokussiert gerichtet ist,
 - einem Spektrometer zur Aufnahme der Ramanstreustrahlung des Blutes des vom Laserlicht bestrahlten Blutgefäßes über mindestens eine Leitung und
 - einer Steuereinheit zu xyz-Positionierung der Vorrichtung auf das
 - 25 in das Ei eingebrachte Loch,
- eine Geschlechtsbestimmungs-Auswerteeinheit, die mit dem Spektrometer und der Blutgefäß-Positionier-Auswerteeinrichtung in Verbindung steht und aus der verarbeiteten erfassten Ramanstreustrahlung des Spektrometers das Geschlecht des bebrüteten Vogeleies angibt.

30

Der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann als Visions-System eine Einrichtung zur Feststellung der Lage von Blutgefäßen innerhalb des Eies zugeordnet sein.

Die Einrichtung zur Feststellung der Lage eines Blutgefäßes ist über mindestens eine versorgungs- und signaltechnische Leitung mit der Steuereinheit verbunden.

Die Einrichtung zur Feststellung der Lage eines Blutgefäßes kann mit einer Höhenverstelleinrichtung und der Ei-Lagerungseinheit in Verbindung stehen.

Die Einrichtung zur Feststellung der Lage eines Blutgefäßes, die Höhenverstelleinrichtung und die Ei-Lagerungseinheit können mit der Blutgefäß-Positionsauswerteeinrichtung mittels programmtechnischer Mittel zur Durchführung einer Koordinierung der Lage des Blutgefäßes verbunden sein.

Die optische Vorrichtung kann eine flexible optische Faser sein.

Die Strahlungseinrichtung kann vorzugsweise grünes Licht zur Erkennung zumindest eines Blutgefäßes emittieren.

Die Auswerteeinheit kann programmtechnische Mittel zur Geschlechtsbestimmungs-Auswertung der erfassten Ramanstreuung und der erfassten CARS-Streuung aufweisen.

20

Im Folgenden wird die Funktionsweise der erfindungsgemäßen Vorrichtung näher erläutert:

Über einem detektierten Blutgefäß wird ein Loch in die Kalkschale mittels einer Locherzeugungseinheit eingebracht. Auf das freigelegte Blutgefäß wird ein Laser fokussiert und vom gleichen Ort wird durch das Loch hindurch die Ramanstreuung gesammelt und zurück zu einem Spektrometer zugeführt. Das alles geschieht unter Beobachtung, Überwachung und Kontrolle des mit sichtbarem/grünem Licht durchleuchteten Eies.

Mit einer ständigen Durchleuchtung des Eies kann eine zeitabhängige Bildung mindestens eines Blutgefäßes und der späteren Bildung auch der Chorioallantoismembran (CAM) überwacht werden, so dass der Beginn des Messablaufs für den Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens auf die zeitliche Ausbildung des

30

Blutgefäßes und später auch der Chorioallantoismembran (CAM) abgestimmt werden kann.

Es kann die Detektion der Blutgefäße insbesondere bei weißen Eiern mittels Einsatzes von weißem oder grünem Licht durchgeführt werden:

1. Variante: vom Bruttag 0 an bis maximal 4,5 Bruttage ist das Blutgefäßsystem einschließlich des Embryos noch beweglich. Nach der Öffnung des Eies erfolgt ein Absinken des Embryos und somit der Gefäße. Die Lage der Blutgefäße ist nach wenigen Minuten stabil, danach erfolgt eine Messung über ein größeres Loch vorzugsweise etwa 10 mm.
2. Variante: vom Bruttag 4,5 bis Bruttag 21 beginnt sich die Chorioallantoismembran (CAM) zu entwickeln und die Chorioallantoismembran beginnt fest an der Kalkschale zu haften. Dann kann die Messung bei einem kleineren Loch mit 0,1 mm bis 4 mm Durchmesser durchgeführt werden.

15

Die Ramanstreustrahlung wird spektral zerlegt aufgezeichnet und mit vorgegebenen mathematischen Verfahren bearbeitet und gemäß dem Geschlecht klassifiziert.

20 Zusammenfassend weist die Erfindung:

Verfahren und Vorrichtung zur Ramanspektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestimmung von Vogeleiern, insbesondere von Hühnereiern, folgende Schritte auf:

In einem geschlossenen und bebrüteten Ei wird mittels grünem oder weißem oder blauem Licht die Lage von Blutgefäßen bestimmt und an vorgegebener Stelle wird ein Loch in die Kalkschale eingebracht, in dem mittels Laserstrahlung im roten oder nahen-infrarotem Spektralbereich die Ramanstreustrahlung von Blut oder Gewebe hinter der Kalkschale angeregt wird, sowie die Ramanstreustrahlung/das Ramanstreulicht registriert, einer spektralen und statistischen Auswertung zugeführt und das Geschlecht anhand charakteristischer Markerbanden bestimmt werden.

30

Für die Ramanspektroskopischen Messungen werden folgende Maßnahmen derart getroffen, dass

- das Ei bevorzugt steht und das Loch im Bereich des spitzen Pols eingebracht wird, wobei dies vor allem bei einer Lochgröße 10 mm bei drei Bruttagen erfolgt oder bei kleinerem Loch an Bruttagen > 5 Tage auch bei horizontaler Lage des Eies möglich ist,
- das Loch mittels eines Lasers oder mittels eines mechanischen Mittels in die Kalkschale eingebracht wird,
- das Loch der Kalkschale den optischen Zugang zu einem blutdurchflossenen Blutgefäß oder der Chorioallantoismembran (CAM) gewährleistet,
- der Laserstrahl auf das Blutgefäß fokussiert wird und gegebenenfalls automatisch nachgeführt wird (real-time tracking),
- die eingebrachte Leistung des Lasers nicht zu einer lokalen und globalen thermischen Schädigung führt,
- das Ramanstreulicht mit einem Objektiv mit großer numerischer Apertur (typische $NA > 0.3$) gesammelt wird,
- das Ramanstreulicht mit einer Raman-Fasersonde aufgenommen wird,
- das aufgenommene Ramanstreulicht einem Spektrometer zugeführt wird,
- für die Auswertung der Ramanspektren vorzugsweise der Bereich von 500 bis 4000 cm^{-1} (Raman-Verschiebung) genutzt wird,
- die geschlechtsspezifischen Merkmale in den Ramanbanden verschiedener funktioneller Gruppen die z.B in Nukleinsäuren, Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen enthalten sind, die einer mathematischen Analyse zugeführt werden,
- für die mathematische Analyse Verfahren der gestützten und nicht gestützten Klassifizierung eingesetzt werden, wobei die geschlechtsspezifischen Merkmale in einer Merkmalstabelle abgelegt sind,
- die Ramanspektren in der Form korrigiert werden, dass Untergrundsignale durch Fluoreszenz oder andere Streuprozesse eliminiert werden und die Spektren in geeigneter Form normiert werden,
- zur Geschlechtsbestimmung neben dem Blut auch die von Blutkapillaren durchzogene CAM herangezogen werden kann,

- die Geschlechtsbestimmung an jedem Tag zwischen dem Beginn der Bebrütung und dem Schlupf vorgenommen werden kann.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird Nahinfrarotlicht mit einer Wellenlänge von 785 nm (oder 1064 nm) zur Anregung der Ramanstreuung genutzt.

Die Vorteile der erfindungsgemäßen Geschlechtsbestimmung sind

- keine Beeinträchtigung des Schlupfes und der nachfolgenden Entwicklung des Kükens,
- Durchführung der Geschlechtsbestimmung mit hoher Genauigkeit, wobei vorzugsweise eine sichere Bestimmung der späteren geschlüpften Küken, insbesondere zu einem sehr frühen Zeitpunkt und eine kontaktlose Bestimmung ohne Probenentnahme erfolgen als es in den Verfahren und Vorrichtungen des Standes der Technik geschehen ist.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren werden gemäß Fig. 1 keine Informationen über Verbindungen 30, sondern nur über molekulare Bindungen 32, unabhängig von den Verbindungen, erfasst, in denen die molekularen Bindungen 32 vorkommen. Zum Beispiel: Phosphatbindungen können in RNA, DNA, Phospholipiden usw. enthalten sein. Damit wird in der übergeordneten Ebene 32 gegenüber den die Realisierungs-Ebenen 30, 31 darstellenden, bereits veröffentlichten Druckschriften analysiert. In Relation zum Stand der Technik wird festgestellt, dass es generelle Unterschiede zu allen herkömmlichen chemisch-basierten Verfahren (spektroskopischen und nichtspektroskopischen) gibt:

Alle in den im Stand der Technik angegebenen Druckschriften genannten Verfahren erfassen die Anwesenheit/Quantität einzelner spezifischer Verbindungen 30 und Verbindungsklassen 31 (entweder DNA, Eiweiße, Zucker, Hormone).

In dem erfindungsgemäßen Verfahren und der zugehörigen Vorrichtung wird weder auf eine spezifische Verbindung 30 fokussiert noch werden absolute Mengen oder Mengenverhältnisse (Verbindungsklassen 31) im Vergleich zur Druckschrift WO 2014/021715 A2 berechnet.

Es werden gestützte Klassifikationsverfahren angewendet, um das gesamte Spektrum oder einen oder mehrere Spektralbereiche als männlich oder weiblich zu klassifizieren, basierend auf einem Trainingsset, das vorab aus bekannten Spektren oder Spektralbereichen erhalten werden kann.

5

Das jeweilige optische Element zur Strahlführung oder zur rückführenden Strahlführung kann eine flexible optische Faser sein.

10 Weiterbildungen und weitere Ausgestaltungen der Erfindung werden in weiteren Unteransprüchen angegeben.

Die Erfindung wird mittels eines Ausführungsbeispiels anhand zumindest einer Zeichnung näher erläutert.

Es zeigt:

- 15 Fig. 1 eine Darstellung des Unterschiedes zwischen den Bestimmungsebenen (Verbindung, Verbindungsklassen) des Standes der Technik und der Erfindungsebene (molekulare Bindungen einschließlich funktioneller Gruppen),
- 20 Fig. 2 eine schematische Darstellung der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Bestimmung des Geschlechtes von befruchteten und bebrüteten Vogeleiern,
- 25 Fig. 3 eine schematische Darstellung eines Teils der Vorrichtung zur Einbringung von Laserlicht in das Loch der Kalkschale, wobei
- Fig. 3a den dem Ei zugewandten finalen Teil zur Bestrahlung des zumindest einen ermittelten Blutgefäßes und zur Erfassung der Ramanstreustrahlung von Seiten des bestrahlten Blutgefäßes aus und
- 30 Fig. 3b einen vergrößerten Ausschnitt mit Einblick in das Loch der Kalkschale und den möglichen Messpunkten an mindestens einem Blutgefäß des beweglichen Embryos zeigen,

Fig. 4 eine spektroskopische Darstellung der ausgewerteten Ramanstreu-
strahlungs-Intensitäten in einem vorgegebenen Wellenlängenbereich
zur Erkennung des Unterschiedes zwischen weiblichen Vogeleiern und
5 männlichen Vogeleiern, wobei die durchgezogene Linie das Mittelwert-
spektrum für den weiblichen Zustand und die gepunktete Linie das Mit-
telwertspektrum für den männlichen Zustand darstellen, und

Fig. 5 ein Blockschema zur Erläuterung der Funktionsweise zur Klassifizie-
10 rung der rückgeführten und detektierten Ramanspektren und damit zur
Geschlechtsbestimmung des Vogeleiembryos.

In Fig. 2 ist in einer schematischen Darstellung eine Vorrichtung 20 zur Raman-
spektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestimmung eines befruchteten und bebrü-
15 teten Vogeleies 1 gezeigt,

wobei die Vorrichtung 20 zumindest umfasst

- eine Ei-Lagerungseinheit 16, auf der das Ei 1 gelagert ist,
- eine Blutgefäß-Positions-Auswerteeinrichtung 14, die mit der Ei-Lagerungs-
einheit 16 in Verbindung steht,
- 20 - eine Strahlungseinrichtung 19 mit sichtbarem oder grünem Licht 10a einer
Lichtquelle 10 zur Erkennung zumindest eines Blutgefäßes 21,
- einen Detektor 13 für sichtbares oder grünes Licht 10b zur Erkennung von
Blutgefäßen 21, wobei der Detektor 13 mit der Blutgefäß-Positionier-
Auswerteeinrichtung 14 in Verbindung steht,
- 25 - eine Locherzeugungseinheit 29 für ein Loch 2 in der Kalkschale 28 zumin-
dest im Nahbereich des fixierten Blutgefäßes 21,
- eine Vorrichtung 5 zur Einbringung von Laserlicht 3a in das Ei 1,
die zumindest in Verbindung steht mit
- einer das Laserlicht 3a emittierende Laserquelle 3 und
- 30 - einem Spektrometer 8 zur Aufnahme der Ramanstreustrahlung 7 und
- einer Steuereinheit 18 zu xyz-Positionierung der Vorrichtung 5 auf das in
das Ei 1 eingebrachte Loch 2,

- eine Geschlechtsbestimmungs-Auswerteeinheit 9, die mit dem Spektrometer 8 und der Blutgefäß-Positionier-Auswerteeinrichtung 14 über der Steuereinheit 18 in Verbindung steht.

5 Der Vorrichtung 20 ist eine Einrichtung 34 zur Feststellung der Lage der Blutgefäße 21 innerhalb des Eies 1 - ein Visions-System – in Verbindung mit der Strahlungseinrichtung 19 zugeordnet.

Die Einrichtung 34 enthält des Weiteren einen Detektor 13 in Form einer Kamera.

10 Die Einrichtung 34 zur Feststellung der Lage eines Blutgefäßes 21 ist über mindestens eine versorgungs- und signaltechnische Leitung 17 mit der Steuereinheit 18 in Form einer koordinativen Positioniereinheit verbunden.

15 Die Einrichtung 34 zur Feststellung der Lage eines Blutgefäßes 21 steht mit einer Höhenverstelleinrichtung (nicht eingezeichnet) und der Ei-Lagerungseinheit 16 in Verbindung.

20 Die Einrichtung 34 zur Feststellung der Lage des Blutgefäßes 21, die Höhenverstelleinrichtung, z.B. innerhalb der koordinativen Positioniereinheit 18 und die Ei-Lagerungseinheit 16 können in der Blutgefäß-Positions-Auswerteeinrichtung 14 mittels programmtechnischer Mittel zu einer Koordinierung und Feststellung der Lage des Blutgefäßes 21 verbunden sein.

25 Die Strahlungseinrichtung 19 zur Überwachung der Ausbildung von Blutgefäßen 21, 27 kann aus der Lichtquelle 10, einem Filter 11 und einer Linse 12 bestehen und kann auf den oberen Teil des Eies 1 gerichtet sein.

Die optische Vorrichtung 5 kann eine flexible optische Faser sein.

30 Dazu werden folgende Maßnahmen derart getroffen, dass

- das Ei 1 bevorzugt steht und das Loch 2 im Bereich des nach oben gerichteten spitzen Pols mit der Locherzeugungseinheit 29 eingebracht wird, wobei

- Messungen vor allem bei einer Lochgröße 10 mm bei drei Bruttagen, bei kleinerem Loch bei Bruttagen > 5 Tage auch horizontal möglich sind,
- das Loch 2 in der Kalkschale 28 mittels eines Lasers 29 oder mittels eines mechanischen Mittels eingebracht wird,
 - 5 - das Loch 2 der Kalkschale 28 den optischen Zugang zu dem vordem erkannten blutdurchflossenen Blutgefäß 21 gewährleistet,
 - der Laserstrahl 3a auf das Blutgefäß 21 innerhalb des Loches 2 fokussiert wird und gegebenenfalls automatisch nachgeführt wird,
 - die eingebrachte Leistung der Laserquelle 3 nicht zu einer lokalen und globalen thermischen Schädigung des Eies 1 führt (Temperaturanstieg <math><1^{\circ}\text{C}</math> während der Messung) ,
 - 10 - die Ramanstreustrahlung 7 mittels eines Objektivs 6 mit großer numerischer Apertur ($\text{NA}>0,3$) registriert wird,
 - die Ramanstreustrahlung 7 mit einer Raman-Fasersonde 5 aufgenommen wird,
 - 15 - die aufgenommene Ramanstreustrahlung 7 einem Spektrometer 8 über einer Faserleitung 4b zugeführt wird,
 - für die Auswertung der Ramanbanden vorzugsweise der Bereich von 500cm^{-1} bis 4000cm^{-1} (Raman-Verschiebung) genutzt wird,
 - 20 - die geschlechtsspezifischen Merkmale in den Ramanbanden einer mathematischen Analyse zugeführt werden,
 - für die mathematische Analyse Verfahren der gestützten und nicht gestützten Klassifizierung eingesetzt werden, wobei die geschlechtsspezifischen Merkmale in einer Merkmalstabelle abgelegt sind,
 - 25 - die Ramanspektren in der Form korrigiert werden, dass Untergrundsignale durch Fluoreszenz oder andere Streuprozesse eliminiert werden und die Spektren in vorgegebener Form normiert werden,
 - zur erweiterten Geschlechtsbestimmung auch Membranen und Flüssigkeiten des Eies herangezogen werden können,
 - 30 - die Geschlechtsbestimmung an jedem Tag zwischen dem Beginn der Bebrütung und dem Schlupf vorgenommen werden kann.

In Fig. 3 sind schematische Darstellungen eines Teils der Vorrichtung 5 zur Einbringung von Laserlicht 3a in das Loch 2 der Kalkschale 28 gezeigt, wobei in Fig. 3a der dem Ei 1 zugewandte finale Teil zur Bestrahlung des zumindest einen ermittelten Blutgefäßes 21 und zur Erfassung der Ramanstreustrahlung 7 von Seiten des bestrahlten Blutgefäßes 21 aus und in Fig. 3b ein vergrößerter Ausschnitt mit Einblick in das Loch 2 der Kalkschale 28 und den möglichen Messpunkten an mindestens dem Blutgefäß 21 des beweglichen Embryos 23 gezeigt sind.

In Fig. 3a wird von Seiten der Vorrichtung 5 ein auf das Blutgefäß 21 fokussiertes Laserlicht 3a gerichtet. Das Blutgefäß 21 befindet sich außerhalb des Embryos 23. Die entstehende Ramanstreustrahlung 7 wird über das Objektiv 6 von der Vorrichtung 5 erfasst und weitergeleitet. Der Embryo 23 besitzt ebenfalls Blutgefäße 27, die in Fig. 3b ebenfalls Ausgangsort der Messung einer Ramanstreustrahlung 7 sein können. In Fig. 3b ist ein vergrößerter Ausschnitt 22 des in das Ei 1 eingebrachten Loches 2 aus der Fig. 3a gezeigt. Unterhalb des Loches 2 der Kalkschale 28 des Eies 1 befindet sich der Embryo 23 (Graufläche in dem Loch 2) mit seinen embryonalen Blutgefäßen 27 (geschwärzte Darstellungen) sowie mehrere extraembryonale Blutgefäße 21. Beide Blutgefäße 21 und 27 können Orte der Messungen und der Erfassung der Ramanstreustrahlung 7 sein, wobei die möglichen Messorte 24, 25, 26 je nach zeitlicher Ausbildung der Blutgefäße 21 und/oder 27 erkannt und mittels der programmtechnischen Mittel zumindest zum Vergleich mit gespeicherten Ramanspektren in den Steuer- und/oder Auswerteeinheiten 14, 9 festgelegt sein können.

In Fig. 4 ist eine spektroskopische Darstellung der ausgewerteten Ramanstreustrahlungs-Intensitäten in einem vorgegebenen Wellenzahlbereich 800cm^{-1} bis 1800cm^{-1} zur Erkennung des Unterschiedes zwischen weiblichen Vogeleiern und männlichen Vogeleiern gezeigt, wobei die durchgezogene Linie das Mittelwertspektrum für den weiblichen Zustand und die gepunktete Linie das Mittelwertspektrum für den männlichen Zustand darstellen. Es gibt zwischen den Geschlechtskurven deutliche auf die jeweiligen Wellenzahlbereiche bezogenen Unterschiede bzw. Abstände zwischen den beiden Intensitäts-Wellenzahl-Kurven.

Die Untersuchungen und die Fig. 4 zeigen, dass z.B. drei bis vier spektrale Bereiche für die Geschlechtsbestimmung ausreichen können, z.B. kann für eine Geschlechtsbestimmung ein Vergleich der Intensitäten in den absoluten Beträgen durchgeführt werden: für das weibliche Geschlecht (durchgezogene Linie) ist der Intensitätsverlauf zwischen den vorgegebenen Wellenzahlen größer oder kleiner als der Intensitätsverlauf für das männliche Geschlecht (gepunktete Linie) zwischen den gleichen Wellenzahlen, so dass in einem der Wellenzahlbereiche wenigstens ein Intensitätsvergleich stattfinden kann.

Es kann auch eine Ausführung der Lichtquelle mit optischen Filtern der entsprechenden Wellenzahlen vorgesehen sein. Es kann anstelle eines teuren Spektrometers zumindest eine oder mehrere Laserdiode/n oder Lichtquelle/n mit einem wellenzahlzugeordneten Filter, insbesondere einem Interferenzfilter bezogen auf die vorgegebenen Wellenzahlen eingesetzt sein, wobei sich die Wellenzahl ν aus dem Kehrwert der Wellenlänge λ (in Mikrometer) multipliziert mit 10000 ergibt.

Bei der geschlechtsspezifischen Ramanstreuung des einfallenden IR- und/oder NIR-Lichts wird das Blut des Blutgefäßes 21 im Spektrometer 8 derart identifiziert, dass das Geschlecht des geprüften Vogeleis 1 bestimmt und angezeigt werden kann.

Die spektroskopische Auswertung erfolgt in der Auswerteeinheit 9 unter Einbeziehung mathematischer Klassifizierungsalgorithmen.

In Fig. 5 ist die Funktionsweise mit Einbeziehung der Klassifizierung der gemessenen Ramanspektren im Rahmen der Auswertung dargestellt.

Für die Durchführung der spektralen Klassifizierung und deren Ergebnisausgabe wird ein mehrstufiger Prozess angegeben:

1. Schritt der Messung der Ramanspektren des zu untersuchenden Eies 1,
2. Schritt des Qualitätstests der durchgeführten Messung zum Erkennen der Spektren und Eliminieren von unzureichend erkannten Spektren, mit denen keine Auswertung durchgeführt werden kann, wobei geprüft wird, ob die erfassten Spektren folgenden Anforderungen/Kriterien genügen:

- das Verhältnis der integralen Intensitäten der CH_2/CH_3 - Streckschwingungen muss dem des Blutes entsprechen (abweichend vom umgebenden Gewebe oder Flüssigkeiten), bzw. das Verhältnis der Intensitäten von $\text{CH}_2/\text{CH}_3 < 0.3$.
- 5
- das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) der Hämoglobin-Bande (750cm^{-1}) hat mindestens eine Größe von 5:1
3. Schritt der Messwiederholung, falls die beiden Kriterien des vorhergehenden Schrittes nicht erreicht werden,
4. Schritt der Datenvorbehandlung mit
- 10
- einer Reduzierung des spektralen Bereiches auf einen Wellenzahlbereich zwischen 500 cm^{-1} und 4000 cm^{-1} ,
 - einer Unterdrückung des Rauschens mittels Savitzky-Golayfilter,
 - einer Korrektur der Basislinie, z.B. mit einer polynomen Funktion und der Korrektur des Offsets,
- 15
- einer Normierung der Spektren auf integrale Intensität durch Flächen- oder Vektornormierung.
5. Schritt der spektralen Klassifizierung mit
- der Anwendung einer unterstützten (engl. supervised) Klassifizierung. Als Klassifizierungsverfahren kann die SVM - Supporting Vector Machine, LDA -
- 20
- Lineare Diskriminanz Analyse, KNN-Nearest-Neighbour Klassifikation oder ANN-Artificial Neural Networks Verfahren - eingesetzt werden. Auch andere Verfahren, wie z.B. nichtlineare Verfahren/Methoden oder unterstützende Einrichtungen oder SIMCA, können eingesetzt werden. Die LDA klassifiziert mehrere spektrale Bereiche, also die Intensitätswerte dieser Bereiche.
- 25
6. gegebenenfalls Schritt der Verifizierung, wobei hierzu ein Referenzspektren-Set mit Referenzspektren „männlich“ und Referenzspektren „weiblich“ mit bekannter geschlechtlicher Zuordnung benötigt wird. Der Algorithmus vergleicht das Spektrum mit anderen Spektren der Geschlechtsklasse und überprüft die Ähnlichkeit des unbekanntes Spektrums mit den bekannten gespeicherten
- 30
- Spektren.
7. Schritt zur Ausgabe der Ergebnisse der Bestimmung des jeweiligen Geschlechts der Vogeleier, wobei das Ei 1 aussortiert wird, wenn die Mindestsi-

cherheit für „männlich“ gleich oder unter 45% erreicht wird. Andernfalls liegt ein weibliches Ei 1 vor, das weiter bebrütet wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren und die zugehörige Vorrichtung nutzen die
5 Ramanspektren vorzugsweise von Blut extraembryonaler Blutgefäße zur nicht invasiven in-ovo Geschlechtsbestimmung im bebrüteten Vogelei 1.

Folgende Parameter für die Ramanspektroskopie werden eingesetzt:

- 10 - Anregungswellenlängen Laserlicht 3a: > 600 nm, z.B. HeNe Laser 633 nm, Festkörperlaser (Nd basiert z.B. Nd:YAG Laser 1064nm, VIS NIR Diodenlaser z.B. 785 nm),
- Einkopplung des Laseranregungsstrahles 3a direkt mit Spiegeln und/oder mit optischen Fasern,
- 15 - Ramanstreustrahlungsmessungen werden unter Nutzung der optischen Vorrichtungen 5 mit großer numerischer Apertur wie Mikroskop-Objektiven 6 oder einer Raman-Fasersonde 5 durchgeführt,
- Direkte Auskopplung der gesammelten Ramanstreustrahlung 7 mit Spiegeln zum Spektrometer oder Transport mit optischen Fasern,
- 20 - Anwendung von Spektrometern 8 in Form von dispersiven Ramanspektrometern und Fourier Transform Raman Spektrometern.

Zur Bildung der genutzten Blutgefäße 21 und der sich gebildeten Chorioallantoismembran (CAM) wird Folgendes angegeben:

Die Blutgefäße 21 bilden sich ab dem zweiten Bebrütungstag. Etwa am dritten
25 Bebrütungstag zirkuliert das embryonale Blut im Blutkreislauf. In diesem Zeitbereich wird die Messung zur Geschlechtsbestimmung durchgeführt.

Folgende zwei erfindungsgemäße Verfahren werden somit genutzt:

Abhängig vom Bruttag existieren zwei Varianten zur Ramanstreustrahlungsmes-
30 sung:

1. Abschnitt der Zeitdauer der Bewegung des Embryos 23 und
2. Abschnitt der Zeitdauer der Ausbildung der Chorioallantoismembran (CAM) und somit Fixierung des Embryos 23.

Erste Variante:

Bis zum ca. vierten Bruttag ist der Embryo einschließlich der extraembryonalen Strukturen beweglich im Ei 1, d.h. sie sind nicht an der Kalkschale 28 fixiert. Der

5 Messablauf wird wie folgt durchgeführt:

- Überwachung bzw. Beobachtung des Zeitverlaufs des Bebrütens bis maximal zum vierten Bruttag,
- Einbringen eines Loches 2 in die Kalkschale 28 mittels Laser 29 oder mechanischer Perforation, vorzugsweise am spitzen Pol der Kalkschale 28 des Eies
10 1 mit einem Laser 29, mit Durchmessern mit bis zu 18mm, vorzugsweise zwischen 8mm und 15mm,
- Suchen der Blutgefäße 21 mittels des Visions-Systems 34, vorzugsweise mit einer inline Visions-Kamera 13 und einer koaxialen oder lateralen Beleuchtung mit sichtbarem Licht 10a aus einer Lichtquelle 10. Das sichtbare Licht
15 10a kann weißes Licht sein, jedoch wird der Kontrast verbessert bei blauem und/oder grünem Licht. Die Visions-Kamera 13 nimmt das Licht 10b auf. Bringen der Blutgefäße 21 in den Laserfokus der Laserquelle 3, entweder durch Bewegen des Eies 1 oder des Objektivs 6.
- Registrieren der Ramanstreuung 7, wobei während der Messung eine
20 mögliche Bewegung des Blutgefäßes 21 aus dem Fokus heraus durch real-time Tracking der Blutgefäße 21 durch die Überwachung mittels des Visions-Systems 34 vermieden werden kann.

Vorzugsweise erfolgt eine Messung zum dritten Bruttag.

25 **Zweite Variante:**

Ab dem fünften Bruttag sind die extraembryonalen Strukturen nicht mehr frei beweglich, d.h. die Fixierung der Chorioallantoismembran (CAM) an der Kalkschale 28 wird vollführt. Ab diesem Brutzeitpunkt gibt es eine Variante für den Messablauf, der wie folgt durchgeführt wird:

- 30 - Überwachung bzw. Beobachtung des Zeitverlaufs des Bebrütens ab dem fünften Bruttag,

- Identifikation der Position 25, 26 der Blutgefäße 21 oder der Position 24 der Blutgefäße 27 gemäß Fig. 3, 3a mittels Durchleuchtung mit weißem oder blauem oder grünem oder blauem und grünem Licht 10a,
 - Einbringen eines Loches 2 in die Kalkschale 28 im Bereich des identifizierten Blutgefäßes 21, 27 mittels eines Lasers 29 oder mechanischer Perforation, vorzugsweise mit einem Laser, wobei die Löcher 2 mit Durchmessern bis zu 5mm, vorzugsweise zwischen 0.1mm und 3mm ausgebildet werden,
 - Bringen der Blutgefäße 21 in den Laserfokus entweder durch Bewegen des Eies 1 oder Bewegen des Objektivs 6,
 - Registrieren der Ramanstreustrahlung 7 in den Blutgefäßen 21, d.h. es erfolgt eine Messung des Blutes in den Kapillaren oder in größeren Blutgefäßen innerhalb oder unterhalb der Chorioallantoismembran (CAM).
- 15 Nach den jeweiligen Messabläufen erfolgt eine Klassifizierung zur Erkennung des Geschlechtes des jeweils ausgemessenen bebrüteten Vogeleies 1 in der Auswerteeinheit 9.

20 Anstelle der herkömmlichen linearen Ramanspektroskopie kann erfindungsgemäß die nichtlineare CARS-Spektroskopie zur Geschlechtsbestimmung genutzt werden.

25 Die kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering - CARS -) gehört zur nichtlinearen Ramanstreuung. Mittels CARS-Spektroskopie werden die gleichen Molekülschwingungen untersucht, jedoch besteht der Unterschied zur (linearen) Raman-Spektroskopie in der besonderen Anregungsart. Bei der CARS Spektroskopie wird ein Multi-Photonen Prozess zur Anregung der Molekülschwingungen genutzt und ein kohärentes Signal erzeugt. Im Ergebnis wird mittels CARS ein Signal erhalten, welches um Größenordnungen stärker als das der spontanen Ramanemission ist (Faktor 10^5), was zu einer

30

kürzeren Messzeit führt. Weiterhin ist das CARS Signal gegenüber der Anregungswellenlänge blau verschoben und deshalb frei von Fluoreszenz.

Die Anregung erfolgt mittels ultraschneller NIR-Laser, sodass die Eindringtiefe vergleichbar mit der Eindringtiefe bei der NIR-Ramanspektroskopie ist und die Lichtschäden minimiert sind.

Die Sensitivität wird nicht durch die Detektion der CARS Photonen limitiert, sondern eher durch die Unterscheidung zwischen resonanten und nichtresonanten Anteilen des CARS Signals. Verschiedene Verfahren existieren zum Separieren des resonanten Anteiles durch spezielle Konfigurationen zur Anregung/ Sammlung des Lichtes:

- Die polarisationssensitive Detektion,
- die zeitaufgelöste Detektion und
- die spektrale Phasenkontrolle und räumliche Phasenkontrolle.

Alternativ kann das Ramanspektrum aus dem CARS-Spektrum durch eine modifizierte Kramers-Kronig-Transformation oder durch spezielle Rechenmethoden, basierend auf der Annahme maximaler Entropie, erhalten werden.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens gemäß CARS erfolgt Folgendes:

- Das CARS-Spektrum vom Blut des Blutgefäßes 21, 27 wird erfasst unter Nutzung derselben Aufnahmekonfiguration wie für die spontane Ramanspektroskopie abhängig vom Brutzeitpunkt, mit oder ohne Faseroptik,
- Das CARS-Signal kann durch einen breitbandigen Femto-Sekundenlaser als Laserquelle 3 generiert werden, der als Pumplaser und Stokeslaser dient,
- Das CARS-Signal kann aber auch durch zwei Laserquellen 3 generiert werden, einen Breitbandlaser und einen Schmalbandlaser (multiplex CARS),
- Die CARS-Spektren werden zur Klassifikation genutzt.
- Der resonante Anteil des CARS-Spektrum [$\text{Im}(\chi^{(3)})$] wird vom nichtresonanten Anteil [$\text{Re}(\chi^{(3)})$] separiert und nur der resonante Anteil wird für die Klassifikation herangezogen.

Schließlich erfolgt eine gleiche Klassifikationsstrategie der CARS-Spektroskopie wie für die herkömmlichen linearen Ramanspektren gemäß dem Stand der Technik.

5

10

15

20

25

30

Bezugszeichenliste

- 1 Ei
- 2 Loch in der Kalkschale
- 3 Laserquelle/Laserquellen
- 5 3a in das Loch der Kalkschale eingebrachtes Laserlicht
- 4a Laserlicht zum Ei führende optische Glasfaser
- 4b Ramanstreuung zum Spektrometer/Detektor führende optische Glasfaser
- 5 Vorrichtung zur Einbringung des Laserlichtes in das Ei/ Fasersonde
- 10 6 Linse zur Fokussierung des Laserlichtes und zum Sammeln der Ramanstreuung
- 7 Ramanstreuung/Ramanstreulicht
- 8 Spektrometer mit Detektor
- 9 Auswerteeinheit
- 15 10 Lichtquelle
- 10a Licht, mit dem das Ei bestrahlt wird
- 10b transmittiertes bzw. gestreutes sichtbares Licht
- 11 Filter grün
- 12 Linse
- 20 13 Kamera zur Detektion von Licht 10b
- 14 Blutgefäß-Positions-Auswerteeinrichtung
- 15 Steuerleitung
- 16 xyz-Positioniereinheit zur Ei-Lagesteuerung
- 17 Steuerleitungen
- 25 18 koordinative xyz-Positioniereinheit/Steuereinheit
- 19 Strahlungseinrichtung
- 20 erfindungsgemäße Vorrichtung
- 21 extraembryonales Blutgefäß
- 22 Ausschnitt aus Kalkschale
- 30 23 Embryo
- 24 Ort der Erfassung der Ramanstreuung eines embryonalen Blutgefäßes

- 25 Orte der Erfassung der Ramanstreuung eines extraembryonalen Blutgefäßes 21
- 26 Orte der Erfassung der Ramanstreuung eines extraembryonalen Blutgefäßes 21
- 5 27 embryonales Blutgefäß
- 28 Kalkschale
- 29 Locherzeugungseinheit /Laser/mechanische Perforation
- 30 Gebiet der Verbindung
- 31 Gebiet der Verbindungsklassen
- 10 32 Gebiet der molekularen Bindungen
- 33 Erkennungs-Ebenen-Darstellung
- 34 Einrichtung zur Feststellung der Lage von Blutgefäßen/Visions-System
- 35 Leitung

15

20

25

30

Patentansprüche

1. Verfahren zur Ramanspektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestimmung von befruchteten und bebrüteten Vogeleiern (1), wobei der Embryo (23) einschließlich der extraembryonalen Strukturen beweglich im Ei (1) ist und noch nicht zum Zeitpunkt einer Messung der Ramanstreuung (7) an der Kalkschale (28) fixiert ist,
- 5
- gekennzeichnet durch folgende Schritte:
- 10 – Überwachung des Zeitverlaufs des Bebrütens bis zur Ausbildung mindestens eines erkennbaren Blutgefäßes (21, 27),
 - Schaffung eines Lochs (2) in der Kalkschale (28) im Nahbereich des fixierten Blutgefäßes (21, 27) mittels einer Locherzeugungseinheit (29),
 - Suchen der sich im Ei (1) ausbildenden Blutgefäße (21, 27) mittels eines Visions-Systems (34; 19, 13) und einer koaxialen oder lateralen Beleuchtung mit Licht (10a) des sichtbaren Wellenlängenbereiches,
 - 15 – Positionieren zumindest eines Blutgefäßes (21, 27) in den Laserfokus einer Laserquelle (3) entweder durch Bewegen des Eies (1) oder Bewegen eines Objektivs (6) einer Vorrichtung (5) zur Einbringung des Laserlichts (3a) und Erfassung der Ramanstreuung (7),
 - 20 – Registrieren der Ramanstreuung (7) des bestrahlten Blutgefäßes (21, 27) mittels der Vorrichtung (5) zur Einbringung des Laserlichts (3a) und zur Erfassung der Ramanstreuung (7), wobei während der Messung eine Bewegung des Blutgefäßes (21, 27) aus dem Fokus heraus durch Nachführung mittels des Visions-Systems (34; 19, 13) vermieden werden kann,
 - 25 – Auswertung der Ramanstreuung (7) in einer Auswerteeinheit (9),
 - Bestimmung und Anzeige des Geschlechtes des Embryos (23) im Vogelei (1).
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

dass ein Loch (2) am nach oben gerichteten, spitzen Pol des Eies (1) einen Durchmesser bis zu 18mm, vorzugsweise zwischen 8mm und 15mm mittels einer Lochöffnungseinrichtung (29) ausgebildet wird.

- 5 3. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass zur Überwachung des Zeitverlaufs der Vorgänge beim Bebrüten des Vo-
geleies (1) ein Licht (10a) des sichtbaren Wellenlängenbereiches weißes oder
10 blaues und/oder grünes Licht aus der Lichtquelle (10) der Strahlungseinrich-
tung (19) des Visions-Systems (34) eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Verfahren zur Ramanspektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestim-
15 mung von befruchteten und bebrüteten Vogeleiern (1) ab dem dritten Bruttag
durchgeführt wird.
5. Verfahren zur Ramanspektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestimmung von
befruchteten und bebrüteten Vogeleiern (1), wobei die extraembryonalen
20 Strukturen nicht mehr frei beweglich sind und wobei eine Fixierung der Chori-
oallantoismembran (CAM) an der Kalkschale (28) beginnt,
gekennzeichnet durch folgende Schritte:
- Überwachung des Zeitverlaufs des Bebrütens bis eine Fixierung der Cho-
rioallantoismembran (CAM) an der Kalkschale (28) beginnt und bereits
25 Blutgefäße (21, 27) vorhanden sind,
 - Identifikation der Blutgefäßposition (24, 25, 26) mittels Durchleuchtung mit
Licht (10a) des sichtbaren Wellenlängenbereiches aus einer Lichtquelle
(10),
 - Einbringen eines Loches (2) in die Kalkschale (28) mittels einer Locher-
30 zeugungseinheit (29) in Form eines Lasers oder mittels mechanischer Per-
foration im Nahbereich des fixierten Blutgefäßes (21, 27),

- Positionieren der Blutgefäße (21, 27) in den Laserfokus einer Laserquelle (3) entweder durch Bewegen des Eies (1) oder eines Objektivs (6) einer Vorrichtung (5) zur Einbringung des Laserlichts (3a) und Erfassung der Ramanstreustrahlung (7),
- 5 – Registrieren der Ramanstreustrahlung (7) zumindest eines bestrahlten Blutgefäßes (21, 27) und Messung des Blutes in den Kapillaren oder in größeren Blutgefäßen innerhalb oder unterhalb der Chorioallantois-membran (CAM),
- Auswertung der Ramanstreustrahlung (7) in einer Auswerteeinheit (9),
- 10 – Bestimmung und Anzeige des Geschlechtes des Embryos (23) im Vogelei (1).

6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass ein Loch (2) mit einem Durchmesser bis zu 5 mm, vorzugsweise zwi-
15 schen 0,1 mm und 3 mm mittels einer Locherzeugungseinheit (29) ausgebil-
det wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
20 dass zur Überwachung des Zeitverlaufs der Vorgänge beim Bebrüten des Vo-
geleies (1) als Licht (10a) des sichtbaren Wellenlängenbereiches weißes oder
blaues und/oder grünes oder blaues und grünes Licht aus der Lichtquelle (10)
der Strahlungseinrichtung (19) des Visions-Systems (34) eingesetzt wird.

25 8. Verfahren nach Anspruch 5 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Verfahren zur Ramanspektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestim-
mung von befruchteten und bebrüteten Vogeleiern (1) etwa oder ab dem fünf-
ten Bruttag durchgeführt wird.

30

9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,

dass nach den jeweiligen Messabläufen eine Klassifizierung zur Erkennung des Geschlechtes des jeweils ausgemessenen bebrüteten Vogeleies (1) vor der Anzeige des Geschlechtes erfolgt.

5 10. Verfahren nach Anspruch 1 oder 5,

dadurch gekennzeichnet,

dass die Ramanstreustrahlung (7) von Blut extraembryonaler Blutgefäße (21) und/oder von Blut embryonaler Blutgefäße (27) zur nicht invasiven in-ovo Geschlechtsbestimmung im bebrüteten Vogelei (1) genutzt werden.

10

11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10,

dadurch gekennzeichnet,

dass folgende Parameter für die Ramanspektroskopie eingesetzt werden:

- 15 - Anregungswellenlängen des Laserlichts (3a) der Laserquelle (3): > 600 nm (z.B. HeNe Laser 633 nm, Festkörperlaser (Nd basiert z.B. Nd:YAG Laser 1064nm, VIS NIR Diodenlaser z.B. 785 nm),
- Einkopplung des Laseranregungsstrahles (3a) direkt mit Spiegeln und/oder mit optischen Fasern (4a),
- 20 - Ramanstreustrahlungsmessungen werden unter Nutzung von optischen Vorrichtungen (5) mit großer numerischer Apertur wie Mikroskop-Objektiven (6) oder einer Raman-Fasersonde durchgeführt,
- Direkte Auskopplung der gesammelten Ramanstreustrahlung (7) mit Spiegeln zum Spektrometer (8) oder mittels Transports mit optischen Fasern (4b),
- 25 - Einsatz eines Spektrometers (8) in Form von dispersivem Ramanspektrometer und Fourier Transform Raman Spektrometer.

12. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11,

dadurch gekennzeichnet,

30 dass während des Positionierungsvorgangs des Vogeleis (1) permanent rückgeführte Ramanspektren aufgezeichnet und einer Auswertung zugeführt werden, wobei eine automatische Klassifizierung der Ramanstreustrahlung (7) anhand des spektralen Fingerabdruckes des Blutes erfolgt.

13. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Ei (1) pollastig gestellt wird und ein Loch (2) im Bereich des nach
oben gerichteten spitzen Pols bei einer Lochgröße von 10 mm bei drei Brutta-
gen oder bei kleinerem Loch, auch in möglicher Horizontallage, an Bruttagen,
die länger als fünf Tage dauern, eingebracht wird.
14. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Loch (2) der Kalkschale (28) des Eies (1) den optischen Zugang zu
einem blutdurchflossenen Blutgefäß (21, 27) gewährleistet.
15. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Laserstrahl (3a) auf das Blutgefäß (21, 27) automatisch fokussiert
wird.
16. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
dass die eingebrachte Leistung der Laserquelle (3) nicht zu einer lokalen und
globalen Erwärmung des Eies (1) über 40° Celsius führt.
17. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Ramanstreuung (7) mit einem Objektiv (6) mit großer numeri-
scher Apertur ($NA > 0,3$) registriert wird.
18. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Ramanstreuung (7) mit einer Raman-Fasersonde aufgenom-
men wird.

19. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 18,

dadurch gekennzeichnet,

dass die erfasste Ramanstreuung (7) über Faserleitungen (4b) dem Spektrometer (8) zugeführt wird.

5

20. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 19,

dadurch gekennzeichnet,

dass für die Auswertung der Ramanbanden in der Auswerteeinheit (9) der Bereich von 500 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} (Raman-Verschiebung) genutzt wird.

10

21. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 20,

dadurch gekennzeichnet,

dass die geschlechtsspezifischen Merkmale - genetischer Fingerabdruck - in den Ramanbanden der Nucleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipide und Proteine enthalten sind, die einer mathematischen Analyse zugeführt werden.

15

22. Verfahren nach Anspruch 21,

dadurch gekennzeichnet,

dass für die mathematische Analyse Verfahren der gestützten und nicht gestützten Klassifizierung eingesetzt werden, wobei die geschlechtsspezifischen Merkmale in einer Merkmalstabelle einer Auswerteeinheit (9) abgelegt sind.

20

23. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 22,

dadurch gekennzeichnet,

dass die erfasste Ramanstreuung (7) in der Form korrigiert wird, dass Untergrundsignale durch Fluoreszenz oder andere Streuprozesse eliminiert werden und die Spektren in vorgegebener Form normiert werden.

25

24. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 23,

dadurch gekennzeichnet,

dass als Ramanspektroskopie die nichtlineare kohärente Anti-Stokes-Raman-Streuung-Spektroskopie (CARS) genutzt wird, wobei die CARS-Streuung vom Blut des Blutgefäßes (21, 27) unter Nutzung derselben

30

Vorrichtung (20) wie für die spontane lineare Ramanspektroskopie mit oder ohne Faseroptik (5) aufgenommen wird.

25. Verfahren nach Anspruch 24,
5 dadurch gekennzeichnet,
dass das CARS-Signal durch einen breitbandigen Femto-Sekundenlaser als Laserquelle (3) generiert wird, der als Pumplaser und als Stokeslaser dient.
26. Verfahren nach Anspruch 25,
10 dadurch gekennzeichnet,
dass das CARS-Signal durch zwei Laser generiert wird, durch einen Breitbandlaser und einen Schmalbandlaser als Laserquellen (3) zur Nutzung und Auswertung einer multiplexen CARS-Spektroskopie.
- 15 27. Verfahren nach den Ansprüchen 24 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
dass die CARS-Spektren zur Klassifikation genutzt werden.
28. Verfahren nach den Ansprüchen 24 bis 27,
20 dadurch gekennzeichnet,
dass der resonante Anteil des CARS-Spektrum $[\text{Im}(\text{Chi}^{(3)})]$ vom nichtresonanten Anteil $[\text{Re}(\text{Chi}^{(3)})]$ separiert und nur der resonante Anteil für die Klassifikation herangezogen werden.
- 25 29. Verfahren nach den Ansprüchen 24 bis 28,
dadurch gekennzeichnet,
dass für die CARS-Spektroskopie eine gleiche Klassifikationsstrategie wie für die linearen Ramanspektren durchgeführt wird.
- 30 30. Vorrichtung (20) zur Bestimmung der zur Ramanspektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestimmung von befruchteten und bebrüteten Vogeleiern (1), unter Verwendung der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 29, zumindest umfassend

- eine Ei-Lagerungseinheit (16),
- eine Blutgefäß-Positions-Auswerteeinrichtung (14), die mit der Ei-Lagerungseinheit (16) in Verbindung steht,
- eine Strahlungseinrichtung (19) mit Licht (10a) einer Lichtquelle (10) zur Erkennung mindestens eines Blutgefäßes (21, 27), wobei die Strahlungseinrichtung (19) zumindest einen Teil des Eies (1) durchstrahlt,
- einen Detektor (13) für das Licht (10b) zur Erkennung von Blutgefäßen (21, 27), wobei der Detektor (13) mit der Blutgefäß-Positionier-Auswerteeinrichtung (14) in Verbindung steht, wobei die Strahlungseinrichtung (19) und der Detektor (13) zumindest ein Visions-System (34, 19, 13) bilden,
- eine Locherzeugungseinheit (29) zur Schaffung eines Lochs (2) in der Kalkschale (28) im Nahbereich des fixierten Blutgefäßes (21, 27),
- eine Vorrichtung (5) zur Einbringung von Laserlicht (3a) in das geschaffene Loch (2) des Ei (1) und zur Erfassung der Ramanstreustrahlung (7),
die zumindest in Verbindung steht mit
 - einer das Laserlicht (3a) emittierenden Laserquelle (3), wobei das Laserlicht (3a) auf mindestens ein Blutgefäß (21, 27) fokussiert gerichtet ist,
 - einem Spektrometer (8) zur Aufnahme der Ramanstreustrahlung (7) des Blutes des vom Laserlicht (3a) bestrahlten Blutgefäßes (21, 27) über mindestens eine Leitung (4b) und
 - einer Steuereinheit (18) zur xyz-Positionierung der Vorrichtung (5) auf ein in das Ei (1) eingebrachtes Loch (2),
- eine Geschlechtsbestimmungs-Auswerteeinheit (9), die mit dem Spektrometer (8) und der Blutgefäß-Positionier-Auswerteeinrichtung (14) in Verbindung steht und aus der verarbeiteten erfassten Ramanstreustrahlung (7) des Spektrometers (8) das Geschlecht des bebrüteten Vogeleies (1) angibt.

31. Vorrichtung nach Anspruch 30,

dadurch gekennzeichnet,

- 30 dass die Locherzeugungseinheit (29) in Form eines Lasers oder einer Einrichtung zur mechanischen Perforation mit der Blutgefäß-Positions-Auswerteeinrichtung (14) über Leitung (35) in Verbindung steht.

32. Vorrichtung nach Anspruch 30,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Visions-System (34) eine Einrichtung zur Feststellung der Lage der
Blutgefäße (21, 27) mit einem Detektor (13) ist.
- 5
33. Vorrichtung nach Anspruch 32;
dadurch gekennzeichnet,
dass die Einrichtung (34) zur Feststellung der Lage eines Blutgefäßes (21,
27) über mindestens eine versorgungs- und signaltechnische Leitung (17) mit
der Steuereinheit (18) verbunden ist.
- 10
34. Vorrichtung nach den Ansprüchen 32 und 33,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Einrichtung (34) zur Feststellung der Lage eines Blutgefäßes (21,
27) mit einer Höhenverstelleinrichtung und der Ei-Lagerungseinheit (16) in
Verbindung steht.
- 15
35. Vorrichtung nach den Ansprüchen 32 bis 34,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Einrichtung (34) zur Feststellung der Lage des Blutgefäßes (21, 27),
die Höhenverstelleinrichtung und die Ei-Lagerungseinheit (16) in der Blutge-
fäß-Positions-Auswerteeinrichtung (14) mittels programmtechnischer Mittel
zur Durchführung einer Koordinierung der Lage des Blutgefäßes (21, 27) ver-
bunden sind.
- 20
- 25
36. Vorrichtung nach den Ansprüchen 30 bis 35,
dadurch gekennzeichnet,
dass die optische Vorrichtung (5) eine flexible optische Faser ist.
- 30
37. Vorrichtung nach den Ansprüchen 30 bis 36,
dadurch gekennzeichnet,

dass die Strahlungseinrichtung (19) Licht (10a) des sichtbaren Wellenlängenbereiches, zumindest grünes Licht (10a) zur Erkennung mindestens eines Blutgefäßes (21, 27) emittiert.

5 38. Vorrichtung nach den Ansprüchen 30 bis 37,
dadurch gekennzeichnet,

dass die Auswerteeinheit (9) programmtechnische Mittel zur Geschlechtsbestimmungs-Auswertung der erfassten Ramanstreuung (7) und der erfassten CARS-Streuung aufweist.

10

39. Vorrichtung nach den Ansprüchen 30 bis 38,
dadurch gekennzeichnet,

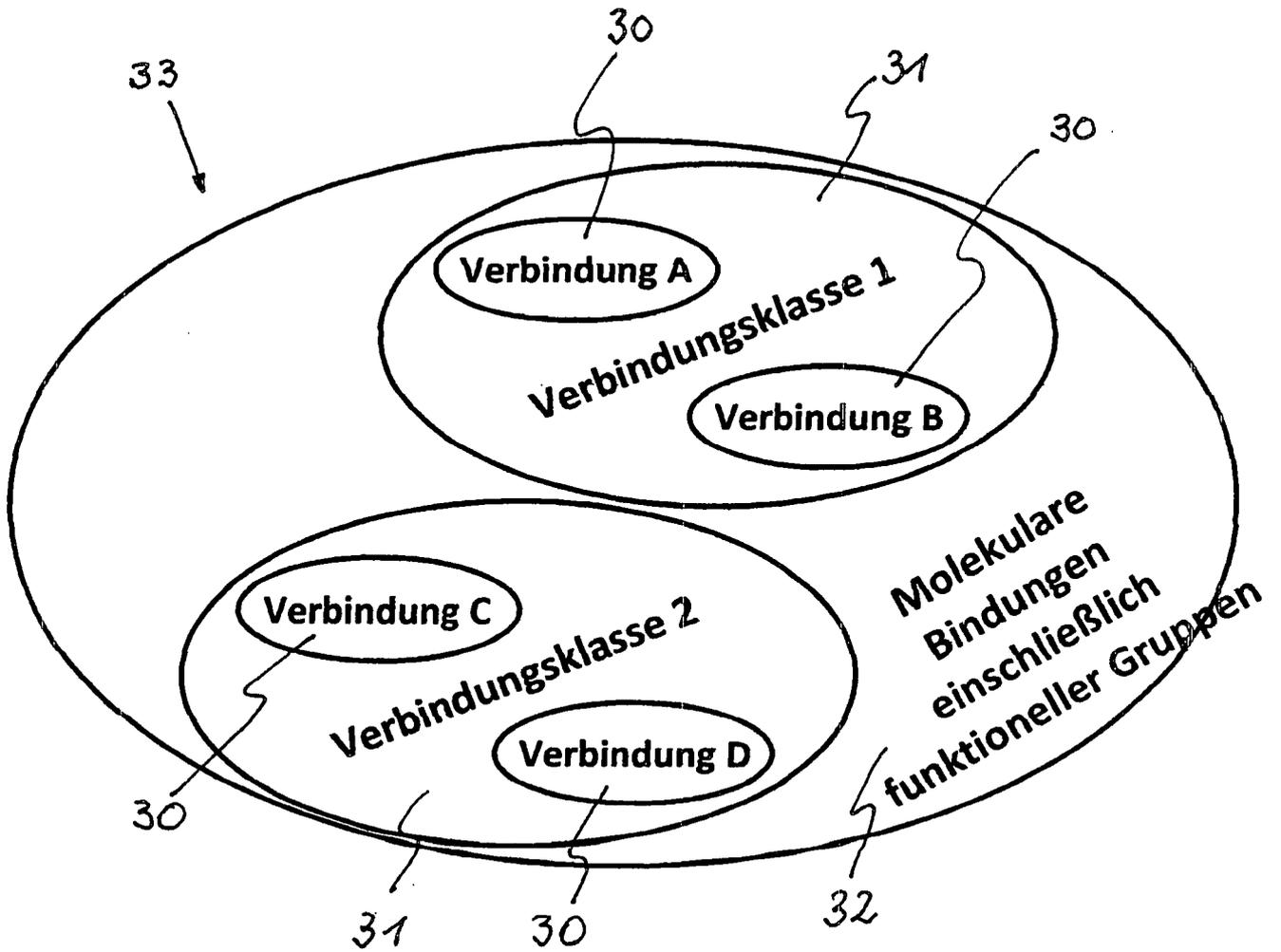
dass die Vorrichtung (5) zur Einbringung des Laserlichts (3a) und der Erfassung der Ramanstreuung (7) mit der Steuereinheit (18) in Verbindung
15 steht, die das Laserlicht (3a) bei beweglichem Embryo (23) auf das ermittelte erfassbare Blutgefäß (21, 27) fokussieren hilft.

20

25

30

Fig. 1



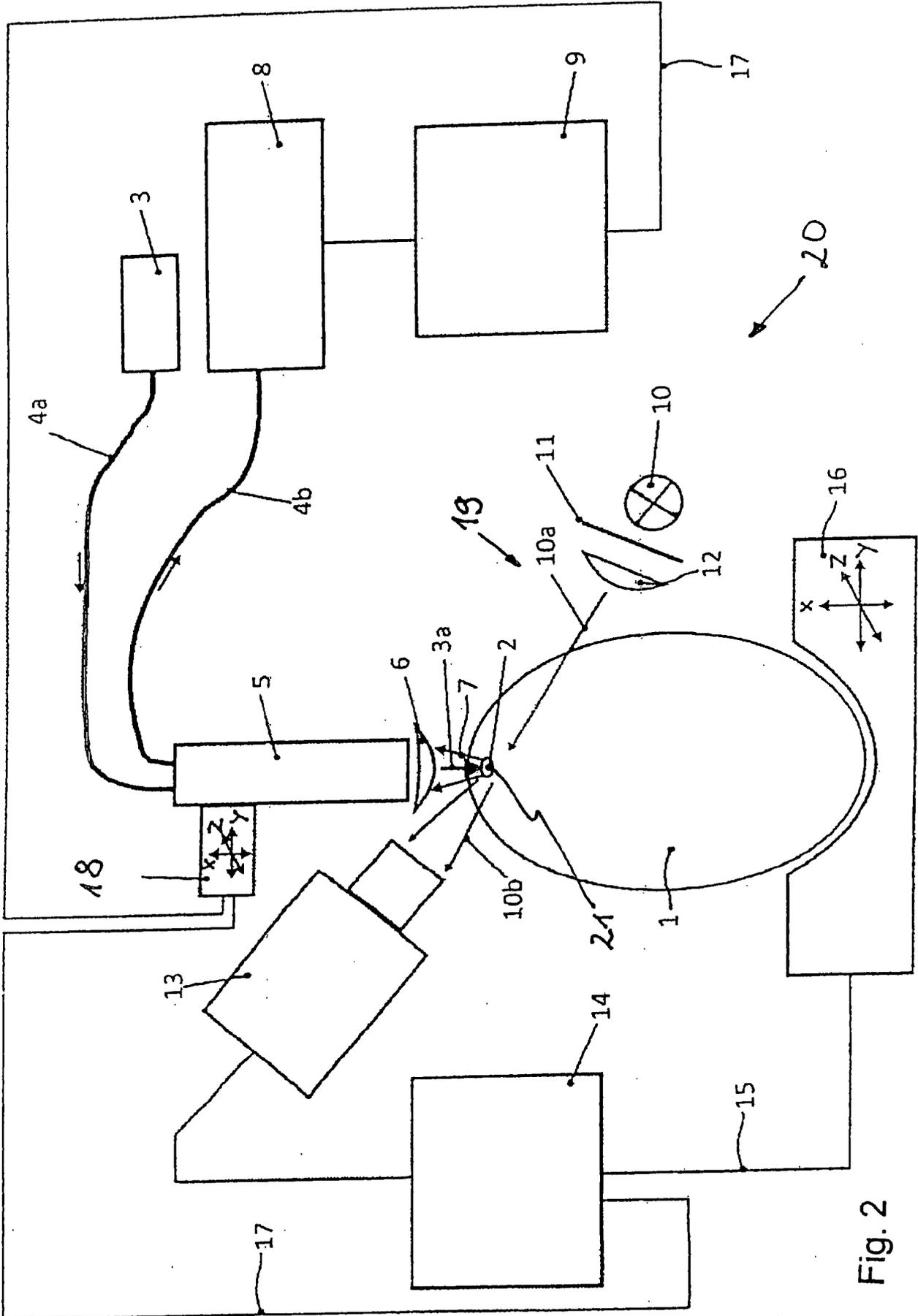
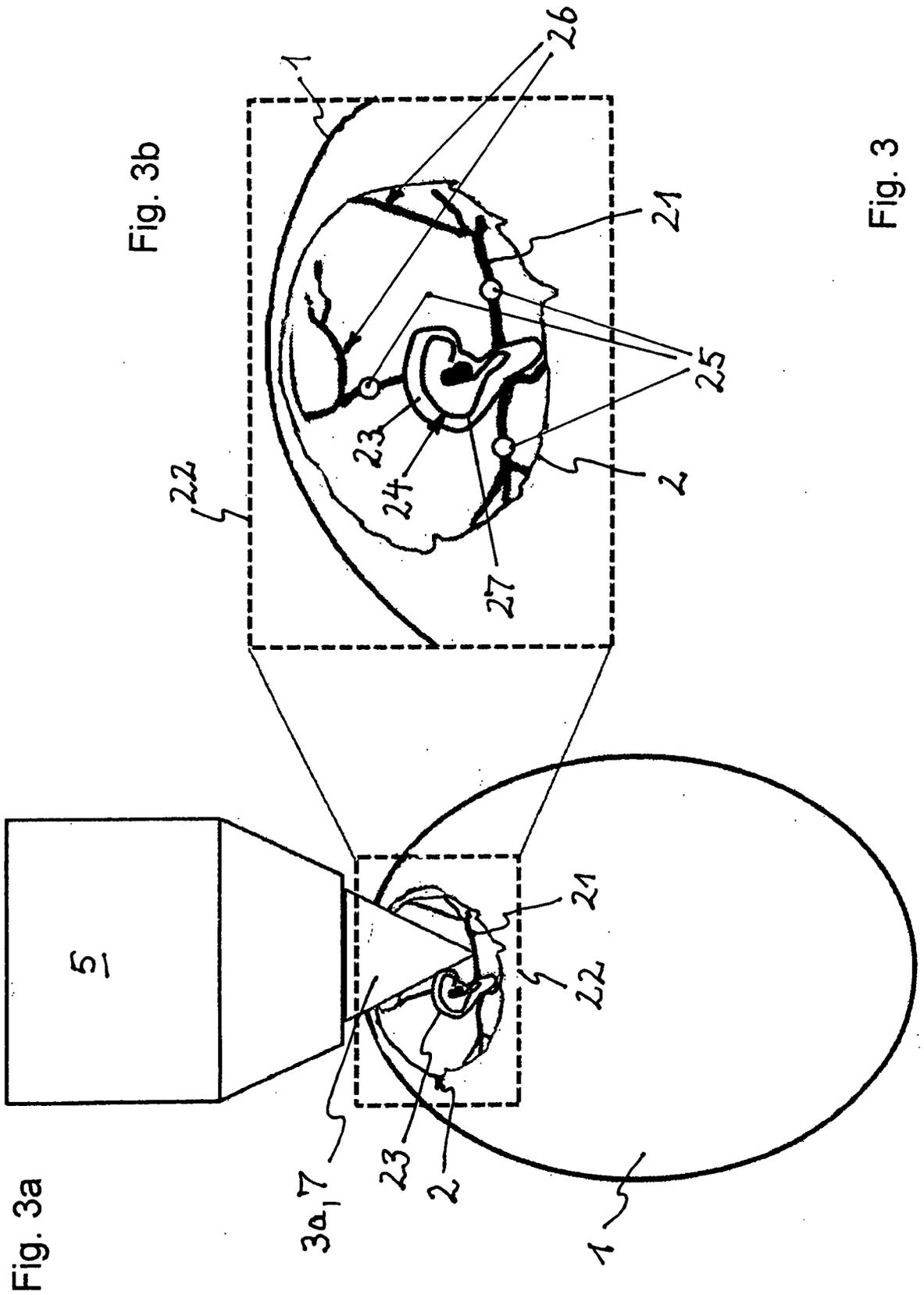


Fig. 2



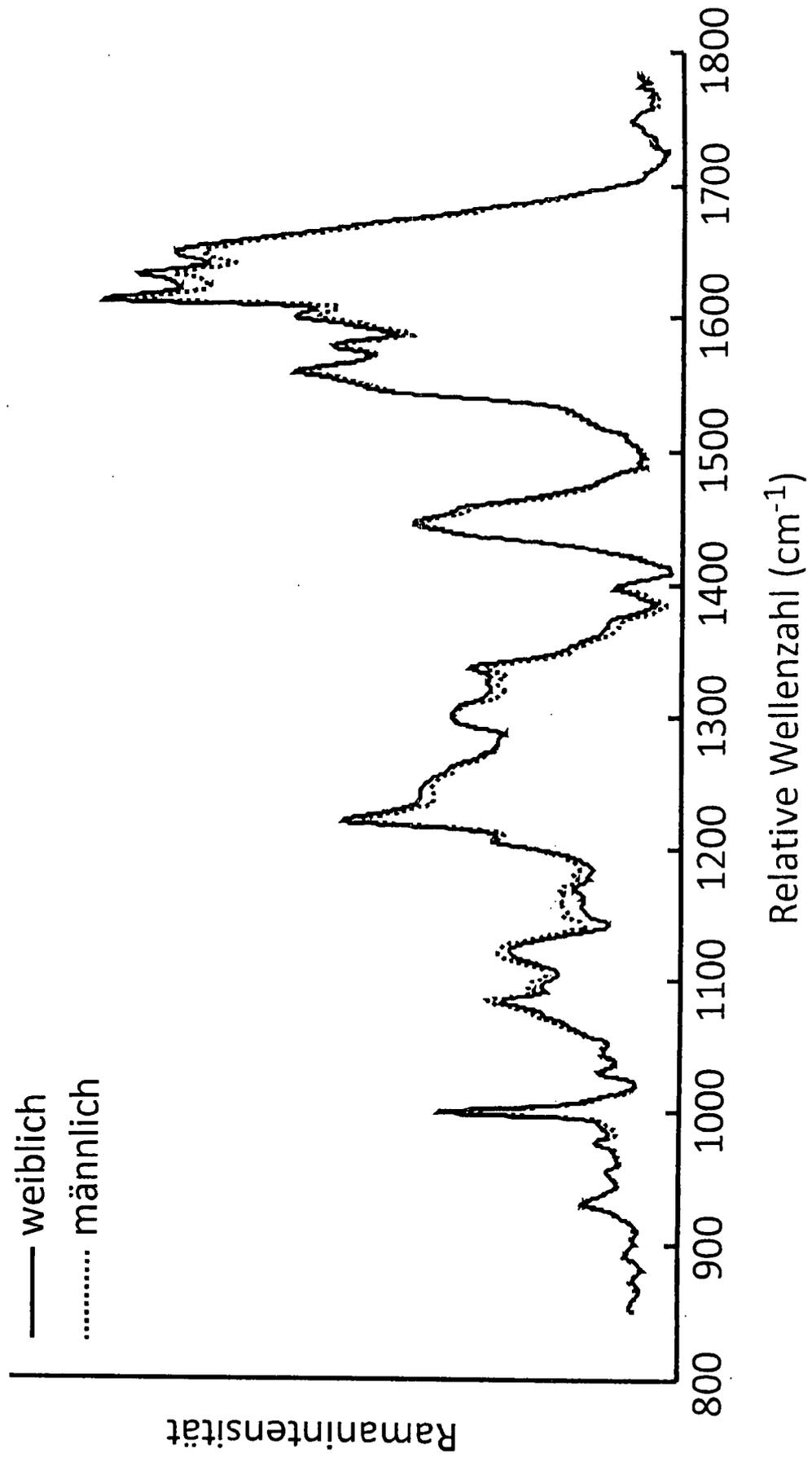
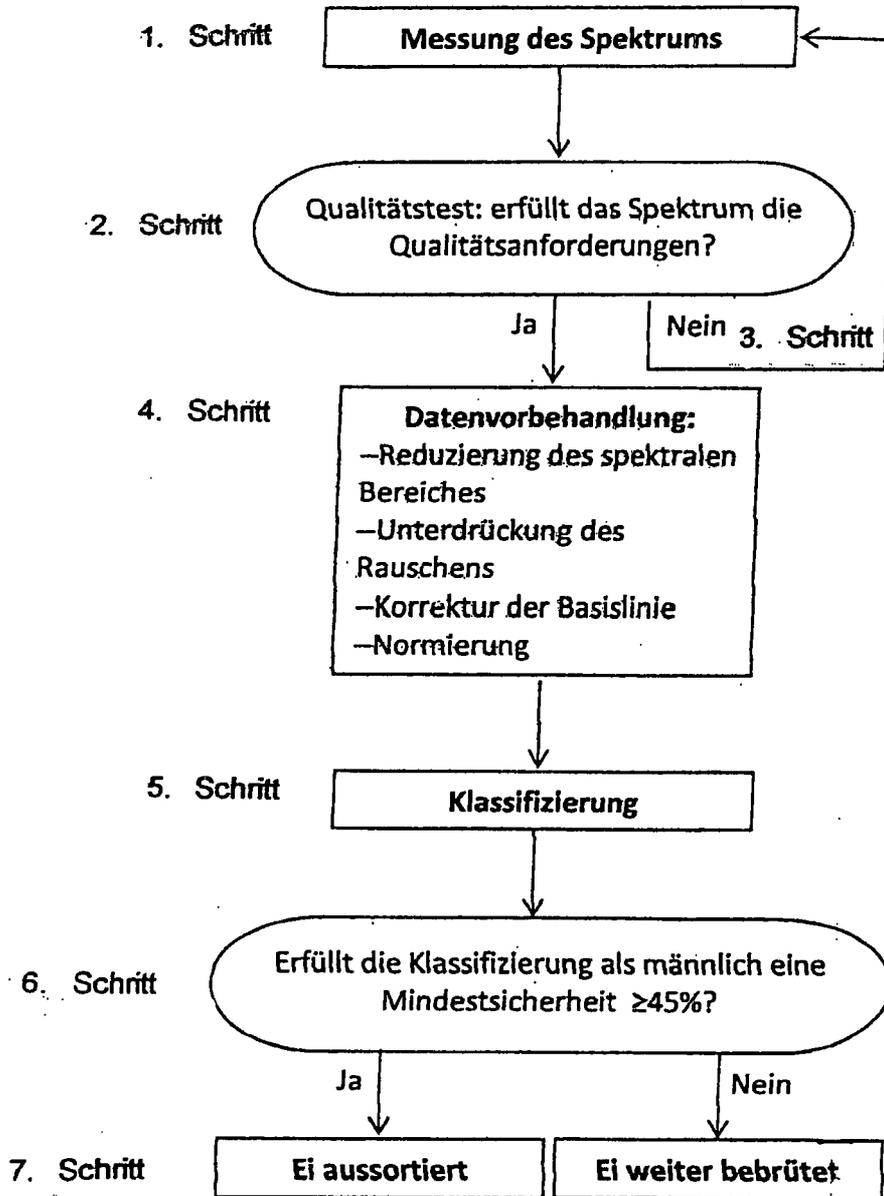


Fig. 4

Fig. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DE2015/000342

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N21/65 G01N33/08
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N G01J
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, COMPENDEX, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 10 2007 013107 A1 (UNIV SCHILLER JENA [DE]; UNIV LEIPZIG [DE]) 18 September 2008 (2008-09-18) cited in the application paragraphs [0001], [0019] - [0024], [0028], [0031] - [0034] claims 1-3, 9, 10 -----	1-39
A	WO 2014/021715 A2 (BRUINS WOUTER SEBASTIAAN [NL]) 6 February 2014 (2014-02-06) cited in the application page 3, lines 12-22 page 7, line 33 - page 8, line 32 claims 1-5, 10, 11 -----	1-39

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 27 October 2015	Date of mailing of the international search report 11/11/2015
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hoogen, Ricarda
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2015/000342

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 102007013107 A1	18-09-2008	NONE	

WO 2014021715 A2	06-02-2014	AU 2013297168 A1	05-03-2015
		CN 104704360 A	10-06-2015
		EP 2880440 A2	10-06-2015
		JP 2015523097 A	13-08-2015
		KR 20150036781 A	07-04-2015
		US 2015260704 A1	17-09-2015
		WO 2014021715 A2	06-02-2014

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. G01N21/65 G01N33/08
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 G01N G01J

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, COMPENDEX, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 10 2007 013107 A1 (UNIV SCHILLER JENA [DE]; UNIV LEIPZIG [DE]) 18. September 2008 (2008-09-18) in der Anmeldung erwähnt Absätze [0001], [0019] - [0024], [0028], [0031] - [0034] Ansprüche 1-3, 9, 10 -----	1-39
A	WO 2014/021715 A2 (BRUINS WOUTER SEBASTIAAN [NL]) 6. Februar 2014 (2014-02-06) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeilen 12-22 Seite 7, Zeile 33 - Seite 8, Zeile 32 Ansprüche 1-5, 10, 11 -----	1-39



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. Oktober 2015

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11/11/2015

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hoogen, Ricarda

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2015/000342

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 102007013107 A1	18-09-2008	KEINE	

WO 2014021715 A2	06-02-2014	AU 2013297168 A1	05-03-2015
		CN 104704360 A	10-06-2015
		EP 2880440 A2	10-06-2015
		JP 2015523097 A	13-08-2015
		KR 20150036781 A	07-04-2015
		US 2015260704 A1	17-09-2015
		WO 2014021715 A2	06-02-2014
