

Stellungnahme der
Technischen Universität Dresden

für die 81. Sitzung des Ausschusses für Ernährung und Landwirtschaft

öffentliche Anhörung

zu:

- a) Antrag der Fraktion der FDP
„Echter Tierschutz statt nationaler Alleingang –
KüKentöten europaweit beenden“
(BT-Drucksache 19/27816)
- b) Antrag der Fraktion DIE LINKE.
„KüKentöten wirklich beenden –
Aufzucht männlicher Küken fördern“
(BT-Drucksache 19/28773)
- c) Gesetzentwurf der Bundesregierung
„Entwurf eines Gesetzes zur Änderung des Tierschutzgesetzes –
Verbot des KüKentötens“
(BT-Drucksache 19/27630)

am Montag, dem 3. Mai 2021,
14:00 Uhr bis 16:00 Uhr



TU Dresden, Medizinische Fakultät
Fetscherstraße 74, 01307 Dresden

An den Ausschuss für
Ernährung und Landwirtschaft
des Deutschen Bundestages
- Alois Gerig, MdB -
Platz der Republik 1
11011 Berlin

Prof. Dr.

Edmund Koch

Leiter der Arbeitsgruppe

Telefon: 0351 458-16132

Telefax: 0351 458-6325

E-Mail: Edmund.Koch@tu-dresden.de

28. April 2021

**Betrifft: Stellungnahme zu dem Gesetzentwurf der Bundesregierung
„Entwurf eines Gesetzes zur Änderung des Tierschutzgesetzes – Verbot des Kükentötens“
(BT-Drucksache 19/27630)**

Sehr geehrter Herr Gerig,

Kurze Erläuterung der spektroskopischen in ovo Geschlechtsbestimmung

Das entwickelte Verfahren beruht auf der Erkennung und Bewertung der geschlechtsspezifischen biochemischen Zusammensetzung des embryonalen Blutes. Mittels der Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie wird der „molekulare Fingerabdruck“ registriert und mit Methoden der künstlichen Intelligenz in „weiblich“ oder „männlich“ klassifiziert.

Der Ablauf der spektroskopischen in ovo Geschlechtsbestimmung ist in der Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Das Ei wird 3,5 Tage bebrütet, es entwickeln sich ein Embryo und ein embryonales Blutgefäßsystem. Am stumpfen Eipol erfolgt automatisiert mit einem Laser die Öffnung durch eine etwa 12 mm große Entdeckung. Der Embryo ist weiterhin durch die innere Schalenmembran von der Umgebung geschützt. Die sichtbaren Blutgefäße erlauben nun eine kontakt- und markerfreie molekulare Analyse mittels Spektroskopie. Das Geschlecht wird mit Methoden der künstlichen Intelligenz sofort erkannt. Eier mit weiblichen Embryonen werden mittels Wundpflaster verschlossen und bis zum Schlupf weiter bebrütet.

Das Verfahren ist seit 2018 wissenschaftlich erforscht und verstanden.

Postadresse

TU Dresden
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus
Fetscherstr. 74, 01307 Dresden

Besucheradresse

Sekretariat: Fiedlerstr. 42
MTZ, Haus 91
Zi.: A.01.054

Internet

<http://tu-dresden.de/med/mf/ksm>



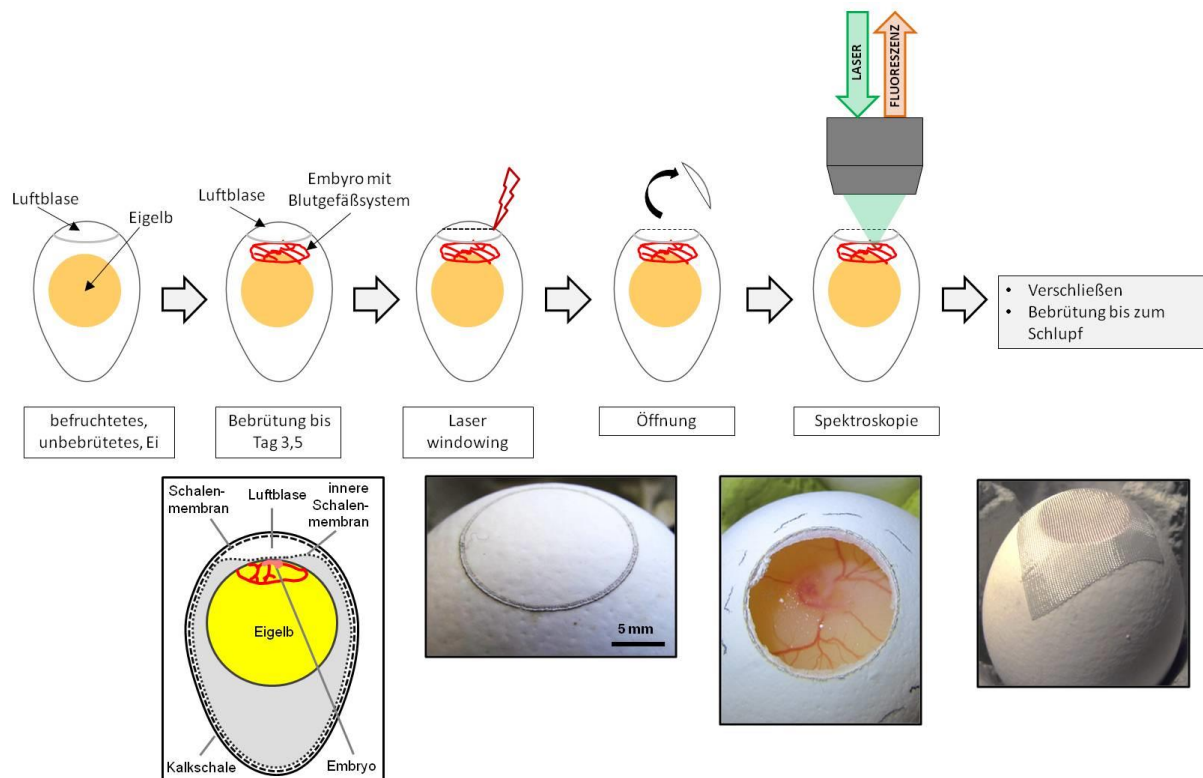


Abbildung 1: Schematische Darstellung zum Ablauf der spektroskopischen in ovo Geschlechtsbestimmung.

Merkmale und Fakten zu der Methode begründet auf den Daten unserer Laboruntersuchungen

Genauigkeit:	mindestens 95%
Geschwindigkeit der spektroskopischen Messung:	etwa 1 Sek / Ei
Einbußen an Schlupf und Legeleistung der Hennen:	keine, bzw. nicht bekannt
erreichbare geschätzte Kosten der spektroskopischen Messung:	etwa 0,01€ / Ei
Umweltbelastungen und Abfälle:	keine
automatisierbar:	ja
parallele Messungen möglich:	ja
erforderliches Verbrauchsmaterial:	Wundpflaster für Eiverschluss

Zur großtechnischen Umsetzung ist noch erheblicher Entwicklungsaufwand, vornehmlich in die Automatisierung und Optimierung des Verfahrens, notwendig. Den geschätzten Kosten des Verfahrens stehen Einsparungen bei der Bebrütung entgegen, sodass die Anwendung insgesamt sogar günstiger werden könnte. Die Kosten verteilen sich auf die gesamte Legeleistung der Henne.

Zurzeit laufende Forschungsarbeiten zur Weiterentwicklung der Methode

- spektroskopische Geschlechtsbestimmung am geöffneten Ei (stumpfer Pol) am Bruttag 5,5.
- spektroskopische Geschlechtsbestimmung am Bruttag 3,5 oder später am geschlossenen Ei.

Das Geschlecht ist am Bruttag 5,5 sogar noch sicherer und schneller als am Bruttag 3,5 bestimmbar. Wie die Abbildung 2 zeigt, liegen nach 5,5 Tagen deutlich größere Blutgefäße vor. Auch der Embryo ist größer und taucht in Richtung Mitte des Eies ab.

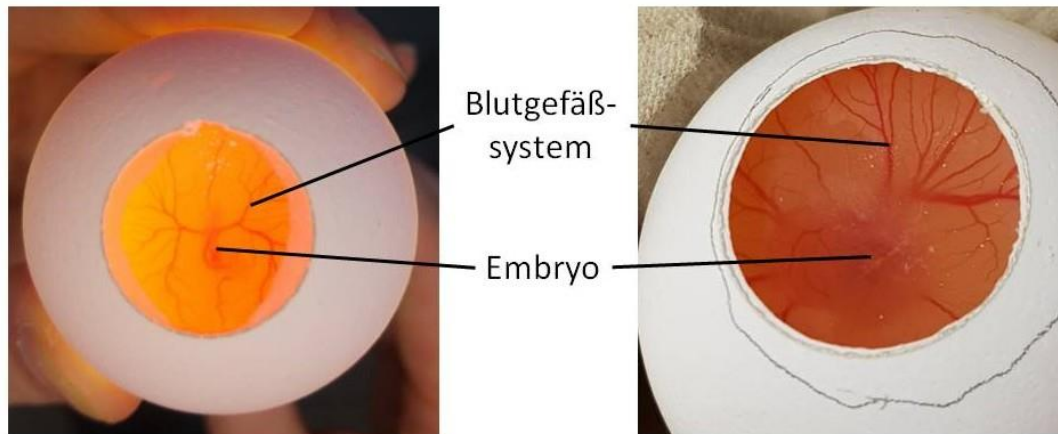


Abbildung 2: Am stumpfen Pol geöffnetes Ei am Bruttag 3,5 (links) und am Bruttag 5,5 (rechts).

In der folgenden Abbildung 3 sind typische Spektren für einen weiblichen und einen männlichen Embryo dargestellt. Die Spektren wurden am Bruttag 5,5 am stumpfen Eipol mit intakter innerer Schalenmembran registriert. Die deutlich unterschiedlichen Intensitäten sind auf Fluoreszenzlicht zurückzuführen.

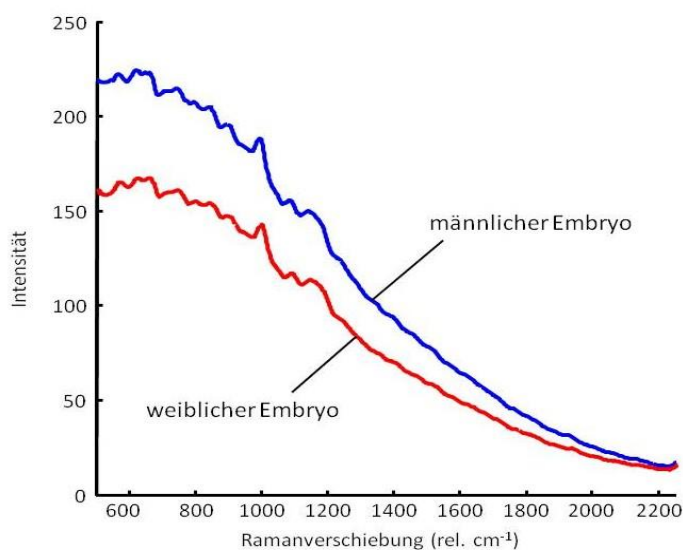


Abbildung 3: Repräsentative Spektren von einem weiblichen und männlichen Embryo.

Dokumente mit weiterführende Informationen (im Anhang)

Abschlussbericht des Förderprojekts „*Verbundprojekt: Etablierung spektroskopischer Verfahren für eine praxistaugliche in ovo Geschlechtsdiagnose beim Haushuhn (Gallus gallus f. dom.)*“

Wissenschaftlicher Aufsatz „*Sexing of chicken eggs by fluorescence and Raman spectroscopy through the shell membrane*“ Journal Plos one,
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554>, publiziert am 23.02.2018

An dieser Zusammenfassung haben Mitarbeiter meiner Abteilung, insbesondere auch Prof. Dr. Gerald Steiner, mitgewirkt.

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Edmund Koch



TU Dresden, Medizinische Fakultät

Fetscherstraße 74. 01307 Dresden

Etablierung spektroskopischer Verfahren für eine praxistaugliche in ovo-Geschlechtsbestimmung beim Haushuhn (Gallus gallus f. dom.)

Schlussbericht

Arbeitsgruppe Klinisches Sensoring und Monitoring

Postadresse

Technische Universität Dresden

Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus

Besucheradresse

Sekretariat:

Fiedlerstr. 42

Internet

<http://www.tu-dresden.de/medksm>

Zuwendungsempfänger: Technische Universität Dresden Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus Klinisches Sensoring und Monitoring 01307 Dresden	Förderkennzeichen: 2813302507
Vorhabensbezeichnung: Etablierung spektroskopischer Verfahren für eine praxistaugliche in ovo-Geschlechtsbestimmung beim Haushuhn (<i>Gallus gallus</i> f. dom.)	
Laufzeit des Vorhabens: 12. Juni 2015 – 31. Dezember 2018	
Berichtszeitraum: 12. Juni 2015 – 31. Dezember 2018	

I Kurzdarstellung

I.1. Aufgabenstellung

Für männliche Nachkommen aus Legehennenlinien existieren derzeit aufgrund negativer Korrelationen zwischen Legeleistung und Muskelmasseansatz kaum Verwendungsmöglichkeiten, die unter ökonomischen Gesichtspunkten als sinnvoll erachtet werden. Allein in Deutschland werden daher jährlich ca. 45 Millionen männliche Nachkommen unmittelbar nach dem Schlupf manuell anhand geschlechtsspezifischer phänotypischer Merkmale aussortiert und getötet. Diese Vorgehensweise stieß ungeachtet des Urteils des OVG Münster (Urt. v. 20.05.2016, Az. 20 A 488/15 und 20 A 530/15) in Deutschland sowohl auf ethische als auch rechtliche Bedenken (§§ 1 und 17 TierSchG, Töten von Wirbeltieren ohne vernünftigen Grund). Ein Verbot dieser Verfahrensweise kann aber erst dann umgesetzt werden, wenn ein hinreichend wissenschaftlich untersuchtes und praxistaugliches technisches Verfahren zur Verfügung steht, welches eine frühzeitige Geschlechtsbestimmung des Embryos im Ei ermöglicht. Bis zum Projektbeginn waren weder in Deutschland noch im Ausland alternative Verfahren bis zur Praxisreife entwickelt worden bzw. wurden zwar bereits patentiert, ohne dass jedoch bislang ihr Funktionsprinzip sowie ihre Effizienz und Präzision in wissenschaftlich überprüfbarer Art und Weise dargestellt wurde.

Das Forschungsvorhaben hatte deshalb die Zielsetzung, die bereits in langjähriger Forschungs- und Entwicklungsarbeit entwickelte Methodik der spektroskopischen Geschlechts-

bestimmung in ein praxisreifes Verfahren zu überführen. Die bereits erfolgreich getestete modulare Demonstratorversion sollte dabei als Basis für ein kommerzielles Diagnosesystem mit einem praxistauglichen Durchsatz an Bruteiern dienen. Dieses Modulsystem sollte beim Haushuhn bereits am 4. Bebrütungstag eine sichere Geschlechtsbestimmung mittels spektroskopischer Analysemethoden einschließlich dazu notwendiger Vor- und Nacharbeiten erlauben, wodurch eine routinemäßige Tötung der männlichen Nachkommen nach dem Schlupf auch unter Praxisbedingungen und unter Beachtung wirtschaftlicher Aspekte vermieden werden kann.

Wesentliche Aufgaben der Arbeitsgruppe Klinisches Sensoring und Monitoring (KSM) der Technischen Universität Dresden bestanden dabei in der methodischen Optimierung des Verfahrens und der Konzeption eines robusten spektroskopischen Moduls mit wirtschaftlich vertretbarer Durchsatzrate, das ohne wesentliche Beeinträchtigung der Schlupfrate und mit hoher Präzision eine in ovo-Geschlechtsbestimmung beim Haushuhn erlaubt.

Die Rechtsauffassung, dass das wirtschaftliche Interesse an speziell auf eine hohe Legeleistung gezüchteten Hennen für sich genommen kein vernünftigen Grund i.S.v. § 1 Satz 2 des Tierschutzgesetzes (TierschG) für das Töten der männlichen Küken aus diesen Zuchtlinien darstellt, wurde aktuell durch ein Urteil vom BVerwG Leipzig (Urt. vom 13.06.2019, Az 3 C 28/16 und 3 C 29/16) bekräftigt und unterstreicht somit nochmals die Notwendigkeit des Forschungsvorhabens.

I.2. Voraussetzungen für die Durchführung des Vorhabens

Die interdisziplinäre Arbeitsgruppe KSM beschäftigt sich seit 2008 mit dem Problem der in ovo Geschlechtsbestimmung. Sie ist durch mehrere Publikationen und Patente zu dieser Thematik ausgewiesen. Einen Schwerpunkt der Arbeitsgruppe bilden spektroskopische Analysemethoden, im Institut stehen dazu hochleistungsfähige bioanalytische Geräte zur Identifizierung und Charakterisierung von komplexen biologischen Proben zur Verfügung. Ebenso verfügt die Arbeitsgruppe über umfangreiche Erfahrungen in der Datenanalyse und Klassifizierung spektraler Daten. Die wissenschaftlichen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, welche durchgehend am Projekt beschäftigt waren, haben bereits mehrfache Großversuche in der Brüterei Cuxhaven-Altenwalde (Lohmann Tierzucht GmbH) sowie in der Versuchsbrüterei des Institutes für Tierschutz und Tierhaltung (ITT) des Friedrich-Loeffler-Institutes (FLI) in Celle durchgeführt und können somit die praktischen Anforderungen des Brutprozesses beurteilen.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Aufgaben der Arbeitsgruppe KSM bestanden im Wesentlichen in der methodischen Entwicklung der spektroskopischen Geschlechtsbestimmung sowie die Konstruktion eines Messkopfes für das Spektroskopiemodul des Diagnosesystems. Einen Schwerpunkt bildete dabei das Erreichen einer kurzen Messzeit, um eine wirtschaftlich akzeptable Durchsatzrate unter Erhalt einer hohen Klassifikationsgüte zu gewährleisten. Die Arbeitspakete beinhalteten im Einzelnen

1. Untersuchungen zum Eihandling:

- Optimierung des optischen Strahlenganges am geöffneten Ei
- Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für die Ei-Öffnung
- Maßnahmen zum Erzielen einer wirtschaftlich akzeptablen Schlupfrate

2. den Aufbau des spektroskopischen Moduls:

- Konzeptionierung des Moduls Geschlechtsbestimmung
- Auswahl und Bewertung praxistauglicher optischer Komponenten
- Optimierung der optischen Konfiguration hinsichtlich einer praxistauglichen Messzeit bei gleichzeitig hoher Klassifikationsgüte

3. die Signalauswertung:

- Auswahl und Validierung der spektroskopischen Raman- und Fluoreszenzsignale zur Identifizierung des Geschlechtes
- Erarbeitung von Filtermethoden zur Mustererkennung von spektralen Signaturen
- Entwicklung und Aufbau eines Klassifikators zur Geschlechtsbestimmung
- Erfassung des Einflusses der Datenvorbehandlung auf die Robustheit des Verfahrens

4. Durchführung von Brutversuchen:

- Erprobung und Bewertung des spektroskopischen Prozesses im Rahmen von Großbrutversuchen unter realen Bedingungen der Geflügelwirtschaft

Die Konzeption eines faserbasierten Messkopfes erfolgte zunächst gemäß der im Projektantrag formulierten Arbeitspakete für Ramanspektroskopische Untersuchungen an 3,5 Tage angebrühten Eiern, welche am spitzen Pol geöffnet wurden. Für diese Untersuchungen wurde ein Zweikamerasystem entwickelt, mit welchem eine automatisierte Blutgefäßdetektion und Fokussierung in das Blutgefäß sowie ein Blutgefäßtracking während der spektroskopi-

schen Messung realisiert werden konnte. Die in der Arbeitsgruppe während der Projektlaufzeit gewonnene und bis dahin in der Literatur vollkommen unbekannte Erkenntnis, dass neben den schwachen Ramansignalen auch die vergleichsweise starken Fluoreszenzsignale des embryonalen Blutes eine Geschlechtscharakteristik sowohl in der Intensität als auch in der spektralen Form aufweisen, erlaubte die Blutgefäßdetektion und die anschließende spektroskopische Geschlechtsbestimmung am stumpfen Eipol. Die Weiterentwicklung des Spektroskopie-Messkopfes für die in ovo Geschlechtsbestimmung am stumpfen Eipol und dessen Optimierung für den industriellen Einsatz bildete nun eine Kernaufgabe im Projekt. In umfangreichen Untersuchungen wurde bestätigt, dass eine spektroskopische Geschlechtsbestimmung allein auf Grundlage der Fluoreszenzsignale durch die innere Schalenmembran erfolgen kann. Die Vorteile liegen unter anderen darin, dass die Fluoreszenzdetektion gegenüber der Registrierung der Ramanstreuung in sehr viel kürzeren Messzeiten und mit enorm robusterer und preiswerterer Gerätetechnik erfolgen kann.

Hinsichtlich der Erfolgsaussichten für die im Antrag formulierte Zielsetzung, das routinemäßig eingesetzte Töten der männlichen Eintagsküken durch eine spektroskopische Geschlechtsbestimmung zu verhindern, ergab sich durch den Wechsel der in ovo Geschlechtsdiagnose vom spitzen zum stumpfen Eipol keine Änderung. Mit der fluoreszenzspektroskopischen Geschlechtsbestimmung anhand des Blutes 3,5 Tage angebrüteter Eier unter Erhalt der inneren Schalenmembran steht nun ein praxisreifes Verfahren zur Verfügung, welches weit vor Einsetzen des Schmerzempfindungsvermögens des Embryos eingesetzt werden kann.

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die Studie baut in ihrer Zielsetzung unmittelbar auf die in den BLE-Forschungsprojekten „Möglichkeiten der in ovo Geschlechtsbestimmung beim Haushuhn (*Gallus gallus* f. dom.) als Alternative zur routinemäßigen Tötung männlicher Eintagsküken aus Legehennenlinien“ (FKZ: 511-06.01-28-1-33.010-07) und „Anwendungsorientierte Untersuchungen zur in ovo Geschlechtsbestimmung beim Haushuhn (*Gallus gallus* f. dom.)“ (FKZ: 511-06.01-28-1-33.025-07) gewonnenen Erkenntnisse und Erfahrungen auf.

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Forschungsvorhaben wurde in einem interdisziplinär aus Veterinärmedizinerinnen, Zoologen, Agrarwissenschaftlern, Physikern, Chemikern und Ingenieuren zusammengesetzten Ver-

bundprojekt durchgeführt. An dem von der Klinik für Vögel und Reptilien der Universität Leipzig koordinierten und wissenschaftlich begleiteten Forschungsprojekt waren weiterhin Wissenschaftler der Abteilung Molekülphysik der Universität Leipzig beteiligt. Die Entwicklung und der Aufbau des Spektroskopie-Modules erfolgten durch die Arbeitsgruppe KSM der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden. Die Konzeption und der Aufbau der Module Eitransport, Eiöffnung und Eiverschluss lagen im Aufgabenbereich der EVONTA GmbH Dresden. Für die Durchführung von Brutversuchen konnte seitens des Forschungskonsortiums neben der zur Lohmann Tierzucht GmbH gehörenden Brüterei in Cuxhaven-Altenwalde auch die Brutmöglichkeiten der Versuchsstation des Instituts für Tiererschutz und Tierhaltung Celle des Friedrich-Loeffler-Instituts genutzt werden. Die molekulargenetische Geschlechtsbestimmung von Blutzellen zur Verifizierung der spektroskopischen Ergebnisse wurde vom Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Leipzig sowie von der Fa. Laboklin in Bad Kissingen durchgeführt.

II Eingehende Darstellung

II.1. Verwendung der Zuwendung

Wie bereits unter I.3. beschrieben, können die Arbeiten im Projektzeitraum in Untersuchungen am spitzen und stumpfen Ei-Pol unterteilt werden.

Spektroskopische Geschlechtsbestimmung am spitzen Ei-Pol

Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Grundlagenprojekte über die Geschlechtsspezifität der Ramansignale des embryonalen Blutes wurde zunächst ein Raman-Inovoskop mit hohem optischen Durchsatz (transportabler Ramanmesskopf, Abb.1) für das Spektroskopie-Modul entwickelt. Die spezielle Konfiguration beinhaltete ein Objektiv der Fa. Mitotoyu mit großem Arbeitsabstand, welcher für den Einsatz des Messkopfes über Eihorden einer Brüterei unverzichtbar ist. Die numerische Apertur dieses Objektivs beträgt $NA = 0.4$, was eine hohe Signalintensität des Ramansignales und somit Spektren mit einem hohen Signal/Rausch-Verhältnis ermöglicht. Durch das Absinken des Ei-Inhaltes nach der Ei-Öffnung am spitzen Ei-Pol wird der Öffnungswinkel des Objektivs jedoch begrenzt, wenn das Blutgefäß nicht zentriert ist oder der Öffnungsdurchmesser des Eies kleiner wird. Ein zu großer Öffnungsdurchmesser für das Ei reduziert jedoch die Schlupfraten und erhöht die Infektionsgefahr. Für die automatisierte, ramanspektroskopische Untersuchung wurde im Ergebnis einer Optimierung zwischen maximaler Raman-Signalintensität und möglichst niedriger Schlupfratenbeeinträchtigung ein Öffnungsdurchmesser von 12mm ermittelt.

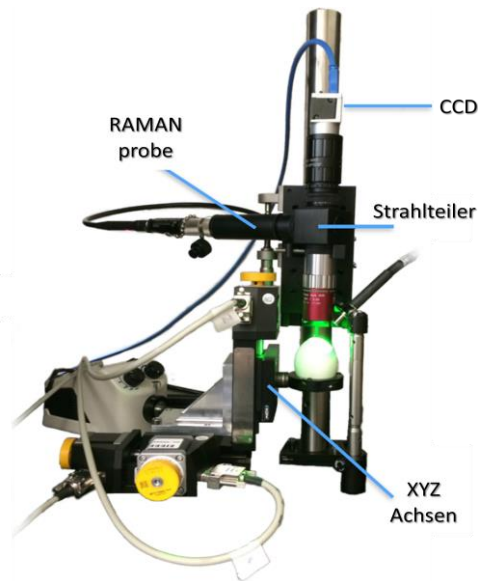


Abb.1: Prototyp des Raman-Inovoskop im Labor AG KSM

In diesem Projekt kam der Umsetzung von automatisierten Prozessabläufen eine zunehmende Bedeutung zu. Zur Raman-spektroskopische in-ovo Geschlechtsbestimmung muss der Anregungslaser exakt in das Zentrum eines embryonalen Blutgefäßes mit einem Durchmesser von 20-200µm positioniert werden. Aufgrund von Bewegungen des Blutgefäßes im Ei, besonders durch das Absinkverhalten der Blutgefäße in z-Richtung, verlässt der Anregungslaser während der Dauer der spektroskopischen Messung jedoch diese Sollposition. Im Projektzeitraum wurde von der AG KSM Dresden ein Zwei-Kamerasystem entwickelt, mit welchem die Arbeitsschritte Vorkontrolle (Auswahl einer reduzierten Bildfläche für die Gefäßsuche) und Messpunktfokussierung für die spektroskopische Messung realisiert wurden. Mit diesem System erfolgte eine automatische Gefäßselektion, eine automatisierte Positionierung des Laserfokus in das Blutgefäß und ein kontinuierliches Nachführen (Autofokussierung/Tracking) mit einer Präzision im Mikrometerbereich während der spektroskopischen Messung. Die sich bewegenden Erythrozyten in den Blutgefäßen bilden dabei den Schärfekindikator zum Blutgefäßtracking. Das zu diesem Verfahren angemeldete Patent (DE 102016005974.5) wurde erteilt. In dem neu konstruierten Modulbaustein für den Demonstrator befanden sich die Eier fest in einer, für kommerzielle Brütereien typischen Eihorde. Die Kameramodule 1 und 2 bewegen sich vollkommen unabhängig voneinander, was einen parallelen Ablauf von Vorkontrolle und spektroskopischer Messung ermöglichte (Abb.2). Dazu wurde eine Kommunikation zwischen Vorkontrolle und Messmodul programmiert, in der die Übergabe der Messpunktkoordinaten des embryonalen Blutgefäßes erfolgt. Eine Vereinfachung

chung und Zusammenführung der Abläufe innerhalb der Labviewprogrammierung erhöhte die Robustheit und die Geschwindigkeit des Prozesses.

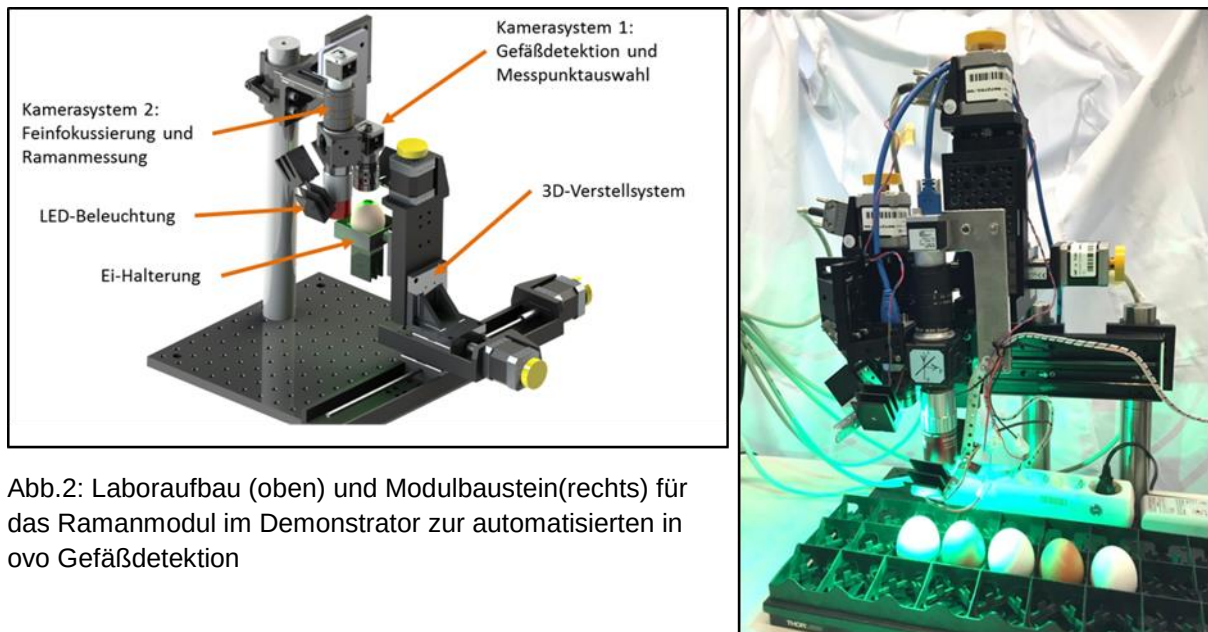


Abb.2: Laboraufbau (oben) und Modulbaustein(rechts) für das Ramanmodul im Demonstrator zur automatisierten in ovo Gefäßdetektion

Entwicklung und Aufbau des Klassifikators zur Geschlechtsbestimmung

In den vergangenen Berichtszeiträumen wurden große Datensätze nunmehr hinsichtlich ihrer Raman- als auch der Fluoreszenzsignale ausgewertet, wobei Klassifizierungen nach unterschiedlicher Datenvorbehandlung verglichen wurden. In diesen Untersuchungen zeigte sich deutlich, dass die Art und Weise der Datenvorbehandlung wesentlich über den Erfolg der Klassifizierung entscheidet.

Zur Auswertung der Raman- und Fluoreszenzspektren der Eier wird ein gestütztes Klassifizierungsverfahren zur Identifizierung des Geschlechts eingesetzt. Ein generelles Problem der gestützten Klassifizierungsverfahren ist die Abwägung zwischen Genauigkeit der erzielten Zuordnungen und Robustheit der Klassifizierung. Häufig lassen sich sehr hohe Genauigkeiten nur bei einem sogenannten Übertraining des Klassifikators erzielen. Darunter wird verstanden, dass der Klassifikator nur bestimmte Spektren noch richtig zuordnen kann, wobei dies mit sehr hoher Genauigkeit geschieht. Dagegen führen bereits geringste Abweichungen oder Störeinflüsse zu einer dramatisch reduzierten Genauigkeit der Klassifikation. Ziel ist daher eine Anpassung zwischen bestmöglicher Klassifizierung und hoher Robustheit der Klassifizierung.

Die im Verfahren der Geschlechtsbestimmung registrierten in-ovo Spektren zeichnen sich durch eine hohe natürliche Variabilität aus. In der Arbeitsgruppe KSM wurde deshalb ein neues Verfahren einer „multiplen Klassifizierung“ der komplexen in ovo Spektren entwickelt und getestet, welches eine hohe Klassifizierungsgenauigkeit bei gleichzeitigem Erhalt einer hohen Stabilität der Klassifizierung erreicht. Gleichzeitig wird damit ein Übertrainieren des Klassifikators vermieden.

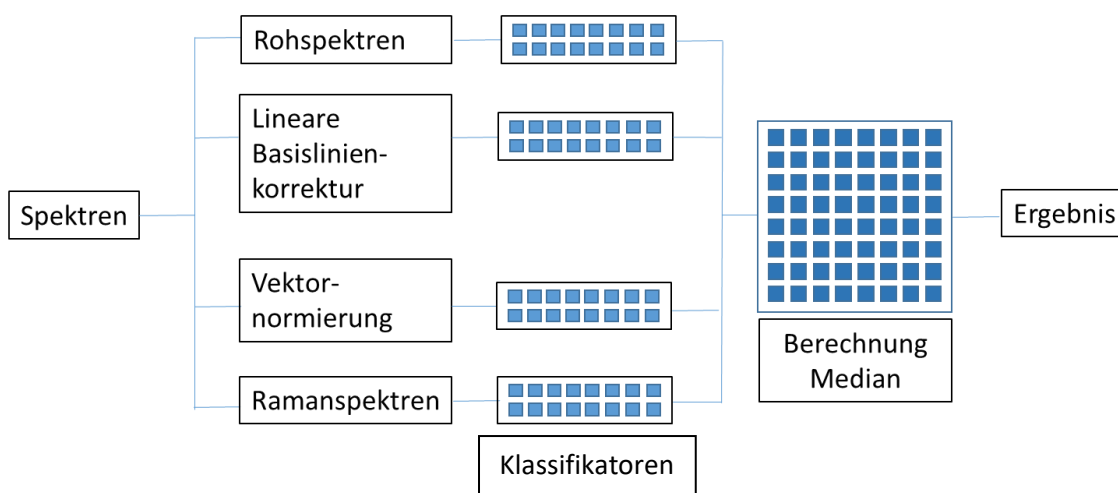


Abb 3: Vereinfachtes Schema zur Darstellung des multiplen Klassifikationsalgorithmus

Im dem entwickelten multiplen Klassifikationsalgorithmus wird berücksichtigt, dass es bei der Auswertung der registrierten in ovo Spektren unter den verschiedenen Verfahren der Datenvorbehandlung wie beispielsweise der linearen Basislinienkorrektur oder der Vektornormierung kein einzelnes optimales, bestes Verfahren gibt. Wie in Abb. 3 gezeigt, wird jedes Spektrum zum Erstellen des Klassifikators in diesem Verfahren mehrfach mit unterschiedlichen Datenvorbehandlungen klassifiziert. Die erhaltenen Werte der Matrix werden mittels Berechnung des Medians gleichberechtigt in das Klassifikationsergebnis einbezogen. Bei Anwendung des multiplen Klassifikationsverfahrens auf die im Labor und in der Brüterei mit dem Raman-Modulbaustein erstellten Datensätze ergaben sich Prognosegenauigkeiten von 95-98%. Das Verfahren der multiplen Klassifikation wurde in einer Patentschrift unter dem Titel „Verfahren zur Klassifizierung von Spektren mit komplexem Informationsgehalt“ eingereicht.

Spektroskopische Geschlechtsbestimmung am stumpfen Ei-Pol

Innerhalb des Projektzeitraumes zeigte sich, dass geschlechtsspezifische Merkmale nicht nur in den DNA-Signalen und im Proteinprofil der Ramanspektren zu finden sind, sondern auch im Fluoreszenzsignal des embryonalen Blutes vorliegen. Die Fluoreszenzspektren des embryonalen Blutes von Hühnern weisen sowohl in der Intensität als auch in der spektralen Charakteristik eine starke Geschlechtsspezifität auf.

Die Intensitätsverhältnisse zwischen männlicher und weiblicher Fluoreszenz sowie das spektrale Profil hängen dabei auch von der Frequenz des Anregungslichtes ab. Für eine Anregungswellenlänge von 785nm ist die integrale Intensität der Fluoreszenz des männlichen größer als die des weiblichen Blutes (Abb.4). Im spektralen Profil der Fluoreszenzspektren zeigt sich deutlich eine "männliche Komponente" mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von ca. 910nm.

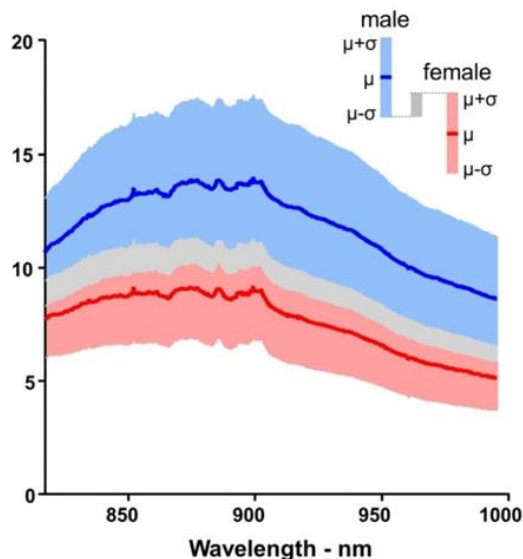


Abb. 4: Fluoreszenzspektren des Blutes 3,5 Tage alter Hühnerembryonen der Herkunft Lohmann Selected Leghorn (LSL), [entnommen aus Galli 2017]

Weiterhin konnte in unseren Untersuchungen festgestellt werden, dass für die geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Fluoreszenzspektren ein Zeitfenster in der Embryonalentwicklung existiert, wobei innerhalb des Untersuchungsfensters von 3,5 bis 11,5 Bruttagen die größten spektralen Unterschiede am Tag 3,5 der Inkubation auftreten. Eine Abnahme der Geschlechtsspezifität im Fluoreszenzspektrum ist bis zum Bruttag 7,5 zu beobachten, nach einer Brutdauer von 9,5 bzw. 11,5 Tagen waren geschlechtsspezifische Unterschiede im Fluoreszenzspektrum nicht mehr registrierbar (Abb.5).

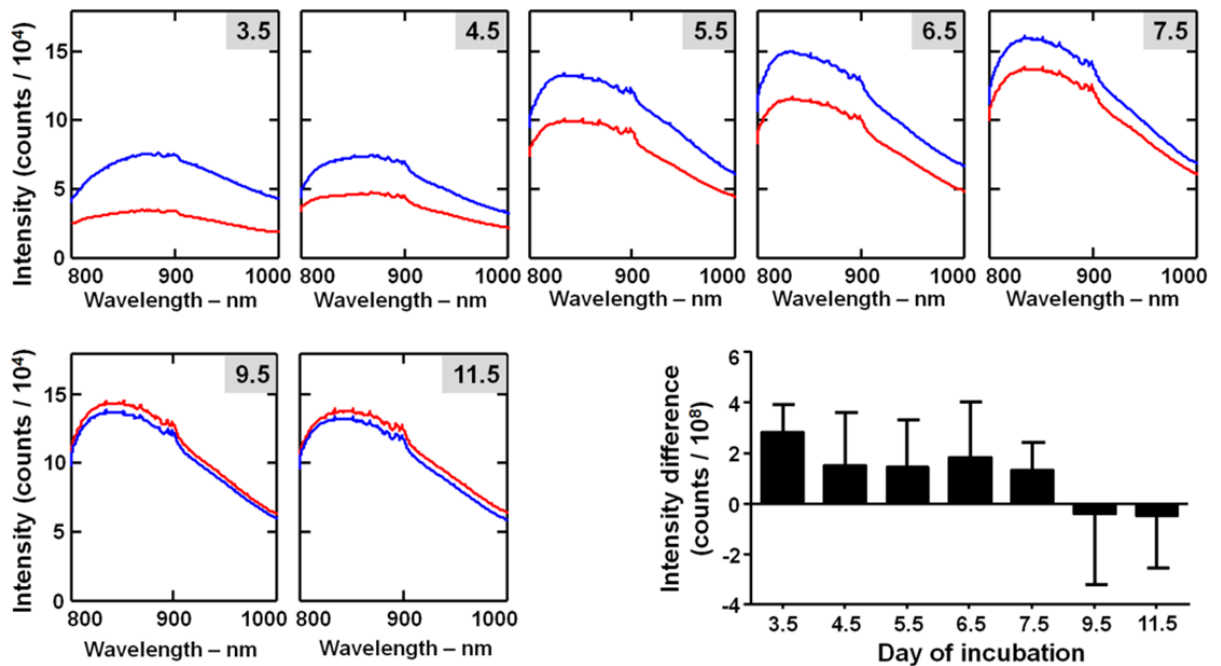


Abb. 5: Fluoreszenzspektren des Blutes von Hühnerembryonen angebrüteter Hühnereier der Herkunft Lohmann Selected Leghorn (LSL) zwischen dem Bruttag 3,5 und dem Bruttag 11,5; blau: männlich, rot: weiblich [entnommen aus Galli 2017]

Für die spektroskopischen Untersuchungen am stumpfen Pol wurde ein für den industriellen Einsatz optimierter Dual-Wellenlängenmesskopf aufgebaut und in umfangreichen Messserien getestet. Für die Automatisierung am stumpfen Eipol ist es zwingend erforderlich, die genaue Position der Blutgefäße durch die innere Schalenmembran in allen Raumrichtungen zu erfassen. Für die schnelle und hochpräzise Positionierung des Lasers im Mikrometerbereich ist ein sogenannter Schärfeindikator notwendig. Bei der Geschlechtsbestimmung am spitzen Pol konnte dazu die Fließbewegung der Erythrozyten genutzt werden. Am stumpfen Pol war die Fließbewegung der roten Blutkörperchen in den Blutgefäßen jedoch bei ca. 25% der Eier nur eingeschränkt oder gar nicht sichtbar, da die Transparenz der inneren Schalenmembran in diesen Eiern aufgrund der natürlichen Variabilität zu niedrig ist. Mit den im Berichtszeitraum durchgeführten Untersuchungen konnte nun ein für die Geschlechtsbestimmung am stumpfen Eipol geeigneter, neuer Schärfeindikator ermittelt werden. Mit einem zweiten, geringfügig höherfrequenten Laserstrahl lassen sich in kürzester Zeit und präzise Informationen zur Lage der Blutgefäße ermitteln. Weiterhin ist durch die Nutzung mehrerer Laser verschiedener

Wellenlängen eine interne Referenzierung und damit eine robustere Klassifizierung selbst bei kleineren oder dezentral liegenden Blutgefäßen sichergestellt.

Gekoppelt wurde der Dualmesskopf mit industrietauglichen, handlichen und preiswerten Prozessspektrometern, welche für den Einsatz in einer kommerziellen Brüterei wesentlich geeigneter sind als wissenschaftliche Laborspektrometer.

Die fluoreszenzspektroskopische Geschlechtsbestimmung am stumpfen Eipol mittels der zwei-Wellenlängenmessung ist damit die Methode der Wahl.

Brutversuche

Im Projektzeitraum wurden mehrere Labor- und Großbrutversuche in den Brütereien der Lohmann-Tierzucht GmbH in Cuxhaven und des ITT in Celle an insgesamt mehreren Tausend Eiern durchgeführt. Bei der Öffnung am spitzen Pol zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Schlupfrate und des relativen Schlupfgewichtes (Schlupfgewicht bezogen auf das Ausgangsgewicht des Eies) vom Öffnungsdurchmesser des Eies. Im Laborbrutversuch (Gesamtzahl: 210 Eier) betrug der Unterschied in der Schlupfrate bezogen auf vitale Embryonen am Tag 3,5 für weiße Eier mit einer Laserperforation von 10mm im Vergleich zur Kontrollgruppe nur ca.1%, jedoch bereits ca. 14% für eine Lochgröße von 15mm.

Durch den Wechsel der spektroskopischen Geschlechtsbestimmung zum stumpfen Pol konnte für eine Eiöffnung von 12mm kein statistisch signifikanter Unterschied mehr festgestellt werden.

Eine Legeleistungsprüfung an der Universität Bonn zeigte, dass es keine Unterschiede in den Tierleistungsparametern wie beispielsweise Körpergewicht der Hennen, Legebeginn, Futteraufnahme, Eianzahl oder Eigewicht zwischen spektroskopisch untersuchten Tieren aus einem Brutversuch in einer kommerziellen Brüterei und einer Kontrollgruppe gab.

Eine Zusammenfassung der Großbrutversuche ist in Tab.1 gegeben.

Tab.1: Zusammenfassung von Zielen und Erkenntnissen aus den Großbrutversuchen

Zeitraum / Ort	Ziele	Erkenntnisse
11/ 2015; Cuxhaven- Altenwalde;	-Test der automatischen Blutgefäßdetektion in Abhängigkeit des Öffnungsdurchmessers	- in >99,5% der Eier ist ein Blutgefäß innerhalb eines Öffnungsdurchmessers von 12mm zu finden

	- Ermittlung der Schlupfraten in Abhängigkeit des Öffnungsdurchmessers	- erwartungsgemäßer Anstieg der Schlupfrate bei verkleinertem Öffnungsdurchmesser
01/ 2016; Cuxhaven- Altenwalde;	- Test des Raman-Inovoskop unter Praxisbedingungen - spektroskopische Vorhersage des Geschlechts - Legeleistungsprüfung der geschlüpften Küken an der Universität Bonn	- reproduzierbare Spektren mit hohem S/N-Verhältnis unter Brüteriebedingungen registriert - Klassifikationsergebnis mit 95% Genauigkeit an Lohmann Tierzucht übermittelt - keine Abweichungen hinsichtlich tierleistungsrelevanter Parameter zwischen der spektroskopischen Versuchs- und der Kontrollgruppe
05/2017; Cuxhaven- Altenwalde	- Test der Prozesskette des Diagnosesystems	- kein Modul für automatisches Öffnen und Verschließen der Eier, automatisches Gefäßtracking stabil
08/2017; ITT Celle	- Test einer neuer Optik für die Geschlechtsbestimmung am stumpfen Pol	- neue Optik ermöglicht verkürzte Messzeiten von 1 Sekunde - Schlupfrate nicht reduziert
11/2017; ITT Celle	Test des Dual-Head der 1. Generation, Test der Prozessspektrometer	- Zeitverzögerung durch einzelne Bewegung der beiden Objektive über die Eiöffnung → Konstruktion Dual-Head 2. Generation
10/2018; ITT Celle	- Test der finalen optischen Konfiguration (Dual-Head 2. Generation), Ermittlung von Schlupfrate und Klassifikationsgenauigkeit	- kein statistisch signifikanter Unterschied in der Schlupfrate zwischen Versuchsgruppe (93,9%) und Kontrollgruppe (93,8%) bei einer Gesamtzahl von 600 Eiern - Klassifikationsgenauigkeit mit 96% bestätigt

Vorteile der spektroskopischen Geschlechtsbestimmung und Zusammenfassung

Gegenüber auf biochemischer Analytik basierenden Methoden bietet das spektroskopische Verfahren aus ökonomischer Sicht mehrere Vorteile. Dazu zählen u. a. die extrem niedrigen Verbrauchskosten, die durch das Verschlussmaterial für als „weiblich“ identifizierte Eier entstehen. Eine sehr gute Eignung konnte für verschiedene medizinische Pflaster nachgewiesen werden, die gut verträglich sind und zudem einen stabilen Verschluss unter Beibehaltung einer gewissen Durchlässigkeit ermöglichen. Zu den Vorteilen der spektroskopischen Geschlechtsbestimmung zählen aber auch Möglichkeiten, die sich aus dem sehr frühen Untersuchungszeitpunkt ergeben. So können während der spektroskopischen Messung nicht entwicklungsfähige Eier erkannt und aus dem Brutprozess entfernt werden.

Weiterhin sind die spektroskopischen Untersuchungen kontaktlos, d. h. es muss kein biologisches Material entnommen werden. Somit müssen zwischen den einzelnen Messungen keine Geräteteile und/oder Materialien gereinigt oder sogar ersetzt werden, wodurch das Risiko einer Verschleppung von Keimen enorm verringert wird.

Eine Messung dauert nur ca. 1 Sekunde, wodurch eine Sortierung der Eier nahezu in Echtzeit ermöglicht wird. Im Gegensatz zu zeitintensiveren Verfahren der Geschlechtsbestimmung ist eine Zwischenlagerung der Eier im Brutschrank bis zum Erhalt der Klassifikationsergebnisse nicht notwendig.

Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal des Verfahrens ist der frühe Zeitpunkt der Geschlechtsbestimmung am Tag 3,5 der Bebrütung. Vor dem 7. Bebrütungstag ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand keine Sensitivität des Hühnerembryos zu erwarten. Aufgrund des frühen Analysetages entfallen zudem im Gegensatz zu Verfahren, die nach längerer Bebrütungsdauer ansetzen, komplizierte Tötungsmethoden der als männlich determinierten Embryonen. Darüber hinaus ist eine Verwertung der aussortierten Eier als tierische Nebenprodukte möglich, beispielsweise als hochwertige Proteinquellen für die Verarbeitung in Futtermitteln.

Mit zielgerichtetem Blick auf die Optimierung der Geschlechtsbestimmung für die industrielle Anwendung kristallisierte sich nach langjährigen Untersuchungen die Fluoreszenzspektroskopie als die geeignetste Methode zur Geschlechtsbestimmung heraus. Sie erlaubt die inovo Geschlechtsbestimmung am stumpfen Eipol. Die Eiöffnung innerhalb der Luftblase des Eies ist automatisierbar, ohne den Embryo durch das Setzen der Laserperforation zu verletzen. Bei der inovo Geschlechtsbestimmung am stumpfen Eipol (Eiöffnung 12mm) und dem damit verbundenen Erhalt der inneren Schalenmembran weisen die Schlupfraten der spektrosko-

pisch untersuchten Küken nahezu keine Differenz zur ungeöffneten Kontrollgruppe auf (Differenz <1%).

Die Klassifikationsgenauigkeit unter Anwendung multipler Klassifikationsalgorithmen lag in den durchgeführten Labor- und Großbrutversuchen bei 95-98%. Die spektroskopische Geschlechtsbestimmung am stumpfen Eipol ist sowohl für braune und als auch weiße Eier anwendbar. Eine Beeinträchtigung von Tiergesundheit und Tierleistungsparametern durch die spektroskopische Untersuchung wurde ausgeschlossen. Damit wurde ein praxisreifes Verfahren zur inovo-Geschlechtsbestimmung entwickelt.

II.2. Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der zahlenmäßige Nachweis der Personal- und Sachausgaben der Arbeitsgruppe Klinisches Sensoring und Monitoring der Medizinischen Fakultät erfolgt direkt durch die Verwaltung der Universität Dresden.

II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit kann angesichts des erfolgreichen Verlaufs der innovativen Forschungsarbeiten, deren Originalität sich nicht zuletzt anhand von Publikationen in hochrangigen Fachzeitschriften sowie in der Anmeldung und Erteilung von mehreren nationalen und internationalen Patentschriften widerspiegelt, als gegeben angesehen werden.

II.4. Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des Verwertungsplanes

Gemäß Verwertungsplan sollten die Ergebnisse der Forschungsarbeiten nach gutachterlicher Prüfung (peer-review) in internationalen Fachzeitschriften publiziert werden. Im Rahmen von Kongressbeiträgen (Vorträge, Poster) sollte darüber hinaus der aktuelle Stand der Forschung präsentiert und öffentlich diskutiert werden. Weiterhin sollten die in diesem Projekt erzielten Forschungsergebnisse und Verfahren gemeinschaftlich verwertet und ggf. patentiert werden. Beide Vorgaben können als vollumfänglich erfüllt betrachtet werden (vgl. Kap. II.6).

II.5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Für zahlreiche Verfahrenserfindungen zur Lösung des Problems über eine Geschlechtsfrühbestimmung im Ei wurden zwar einerseits Patente offengelegt oder erteilt bzw. durch Pressemitteilungen „Durchbrüche bei der Geschlechtsfrüherkennung“ bekundet, den vorliegenden Unterlagen ist jedoch meist nicht zu entnehmen, inwieweit sich die jeweiligen Erfindungen auch praktisch umsetzen lassen. Oft fehlen auch wissenschaftlich überprüfbare Angaben zur Methodik, zur Diagnosegenauigkeit sowie zu weiteren relevanten Aspekten (Schnelligkeit, laufende Kosten, Präzision, Schlupfrate, Tiergesundheit und Leistungsparameter der Hennen etc.). Dies trifft beispielsweise auf das in Kanada entwickelte „Hypereye“-Verfahren zu, das durch sog. „Hyperspectral imaging“ am unbebrüteten Ei nicht nur eine Fertilitätskontrolle, sondern auch eine Geschlechtsbestimmung erlauben soll.

Das sog. „EggXYt“-Verfahren wird ebenfalls als eine praktikable Möglichkeit für die in ovo-Geschlechtsbestimmung bei Hühnern diskutiert (vgl. <https://www.eggxyt.com/>). Es beruht auf Genmanipulation mittels artfremder Fluoreszenz-Markergene. Erreicht werden kann dies durch die Erzeugung gentechnisch veränderter Hennen auf Elterntierebene. Durch Kennzeichnung des Z-Chromosoms von Zuchthennen mit einem Biomarker (einem grün fluoreszierenden, aus Quallen isolierten Protein) können bei Verpaarung mit nicht gentechnisch veränderten Hähnen auf Vermehrungsebene bereits vor der Inkubation männlich determinierte Eier anhand ihres Fluoreszenzverhaltens identifiziert und aussortiert werden. Die aus solchen Verpaarungen schlüpfenden Legehennenküken weisen keine Fremdgene auf (Bruijns et al., 2015).

Bei der unter der Bezeichnung „SELEGGT-Verfahren“ propagierten endokrinologischen Methodik kann das Geschlecht nach neuntägiger Bebrütung bestimmt werden. Die Bruteier werden dazu aus dem Brutschrank genommen, positioniert und auf Fertilität getestet. Alle Eier, in denen Embryonen nachgewiesen wurden, werden anschliessend mit einer feinen Nadel punktiert, und aus der zu diesem Entwicklungszeitpunkt bereits ausgedehnten embryonalen Harnblase wird eine geringe Flüssigkeitsmenge entnommen. In dieser Flüssigkeit befindet sich bei einem weiblichen Embryo ein weibliches Geschlechtshormon (Östronsulfat). Mittels eines Markers, der auf das Vorhandensein von Östronsulfat mit einem Farbumschlag reagiert, lassen sich jetzt Bruteier, die weibliche Embryonen enthalten, von „männlichen“ Eiern sowie nicht entwicklungsfähigen Eier unterscheiden. Für die automatische Beprobung zur Hormonanalyse wurde auf der Euro-Tier 2018 in Hannover erstmals eine Vorrichtung

(SELEGGT Acus) präsentiert, die automatisch die korrekte Positionierung der Eier sowie eine Probenentnahme von Allantoisflüssigkeit und deren Überführung in die Messeinrichtung ausführt. Als gegenwärtig realisierte Stundenleistung wird ein Durchsatz von 3.500 Eiern angegeben (<http://www.seleggt.de>).

Eine Analyse nicht näher benannter Biomarker, die ebenfalls durch Punktion der embryonalen Harnblase gewonnen werden, wird auch bei dem in den Niederlanden entwickelten „In Ovo“-Verfahren als Methode zur Fertilitäts- und Geschlechtsbestimmung bebrüteter Eier verwendet (<https://project.inovo.nl>)

Im Rahmen eines im Juni 2018 von der Technischen Universität München vorgestellten Ansatzes sollen Magnetresonanztomografie und künstliche Intelligenz in der Auswertung der Daten verknüpft werden, um das Geschlecht der Embryonen noch vor Inkubationstag 7, sowie auch den Befruchtungsstatus von Eiern noch bevor Beginn der Inkubation präzise zu bestimmen. Die Kombination dieser beiden Technologien soll es ermöglichen, zum einen das Töten von männlichen Eintagsküken zu stoppen und zum anderen nicht befruchtete Eier in der Lebensmittelindustrie zu verwerten. Laut Pressemitteilung der TU München vom 28.06.2018 wird besonders die Methode zur Bestimmung des Befruchtungsstatus als ausgereift betrachtet. Die Geschlechtsbestimmung funktioniert auch, bedarf aber noch mehr Forschungsarbeit, um die Genauigkeit zu verbessern. Mit der Installation eines Prototyps in einer Brüterei wird in den nächsten zwei Jahren gerechnet. Das Magnetresonanz-Gerät zur Bestimmung der Befruchtung der Eier und des Geschlechts der Embryonen soll dabei identisch sein, nur die Bildauswertung muss auf die jeweilige Messaufgabe hin optimiert werden.

Anfang 2018 konnte die spektroskopische Geschlechtsmethode von einem Forschungskonsortium aus Wissenschaftlern der Abt. Klinisches Sensing und Monitoring der TU Dresden und der Klinik für Vögel und Reptilien der Universität Leipzig außerhalb der im Rahmen des Forschungsprojektes geförderten Arbeiten und ohne Einsatz von Projektmitteln weiterentwickelt werden, wodurch das Geschlecht von frühen Hühnerembryonen durch die unversehrte Eischale hindurch bestimmt werden kann. Das Ei muss also nicht mehr aufwändig geöffnet und verschlossen werden. Aufbauend auf den über mehrere Jahre gewonnenen Kenntnissen, wo und wie das Geschlecht im Ei codiert ist, können spektroskopische Methoden nunmehr so eingesetzt werden, dass das Geschlecht auch durch die intakte Eischale bestimmt werden kann. Nach 3,5tägiger Bebrütung kann das embryonale Blutgefäßsystem bereits durch die Eischale mit bloßem Auge erkannt werden. Für die Geschlechtsbestimmung wird nun ein bestimmter spektraler Teil des Lichtes genutzt. Dazu wird das Ei mit einer herkömmlichen Lichtquelle durchleuchtet. Das von den Blutgefäßen reflektierte, transmittierte und auch ge-

streute Licht wird auf der Eischale aufgefangen und spektroskopisch analysiert. Da das Licht neben den geschlechtsrelevanten Informationen aus dem Blut auch Informationen zu anderen Inhaltsstoffen des Eies trägt, müssen verschiedene mathematische Filter- und Separationsverfahren kombiniert werden, um letztlich die gewünschten, zur Geschlechtsbestimmung verwendbaren Signale zu erhalten. Kein Ei gleicht dem anderen, und so ist gegenwärtig die Beherrschung der optischen Variabilität der Eischale noch anspruchsvoll. Sobald alle störenden Einflussfaktoren in den Spektren eliminiert sind, lässt sich anhand des Hämoglobinspektrums das Geschlecht identifizieren. Die spektroskopische Messung erfolgt innerhalb von wenigen Sekunden. Bereits unmittelbar danach können als „männlich“ identifizierte Bruteier ebenso wie unbefruchtete bzw. nicht entwicklungsfähige Eier aussortiert und einer weiteren Verwendung zugeführt werden. In den Laborversuchen wurden bisher einfache, preiswerte Spektrometer eingesetzt, ein wichtiger Aspekt für den wirtschaftlichen Praxiseinsatz in der Legehennenvermehrung.

II.6. Veröffentlichung von Forschungsergebnissen

Ausgewählte Ergebnisse der Forschungsarbeiten wurden zur Patentierung angemeldet sowie nach gutachterlicher Prüfung (peer-review) in internationalen Fachzeitschriften publiziert. Im Rahmen von Kongressbeiträgen (Vorträge, Poster) wurde darüber hinaus der aktuelle Stand der Forschung präsentiert und öffentlich diskutiert. Wissenschaftler der Arbeitsgruppe KSM waren bei der Erstellung folgender Arbeiten als Autoren direkt beteiligt:

Artikel in Fachzeitschriften mit Gutachtersystem

Galli, R., G. Preusse, C. Schnabel, T. Bartels, K. Cramer, M.-E. Krautwald-Junghanns, E. Koch & G. Steiner (2018): Sexing of chicken eggs by fluorescence and Raman spectroscopy through the shell membrane. *Plos One* 13, e0192554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554>

Krautwald-Junghanns, M.-E., K. Cramer, B. Fischer, A. Förster, R. Galli, F. Kremer, E. U. Mapesa, S. Meissner, R. Preisinger, G. Preusse, C. Schnabel, G. Steiner & T. Bartels (2018): Current approaches to avoid the culling of day-old male chicks in the layer industry, with special reference to spectroscopic methods. *Poult. Sci.* 97, 749–757.

Galli, R., G. Preuße, O. Uckermann, T. Bartels, M.-E. Krautwald-Junghanns, E. Koch & G. Steiner (2017): In-ovo sexing of chicken eggs by fluorescence spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 1185-1194.

Galli, R., E. Koch, G. Preusse, C. Schnabel, T. Bartels, M.-E. Krautwald-Junghanns & G. Steiner (2017): Contactless in ovo sex determination of chicken eggs. *Current Directions in Biomedical Engineering* 3; 131–134.

Galli, R., G. Preuße, O. Uckermann, T. Bartels, M.-E. Krautwald-Junghanns, E. Koch & G. Steiner (2016): In ovo sexing of domestic chicken by Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* 88, 8657–8663.

Steiner, G., G. Preuße, C. Zimmerer, M. E. Krautwald-Junghanns, V. Sablinskas, H. Fuhrmann, E. Koch & T. Bartels (2016): Label free molecular sexing of monomorphic birds using infrared spectroscopic imaging. *Talanta* 150, 155-161.

Artikel in Fachzeitschriften ohne Gutachtersystem

Bartels, T., K. Cramer, R. Galli, E. Koch, G. Preusse, C. Schnabel, G. Steiner & M.-E. Krautwald-Junghanns (2019): Aktuelle Entwicklungen bei der Geschlechtsbestimmung im Hühnerei. *DGS-Magazin*, 5/2019, 20-23.

Bartels, T., K. Cramer, R. Galli, E. Koch, G. Preusse, C. Schnabel, G. Steiner & M.-E. Krautwald-Junghanns (2018): Quand l'oeuf sera-t-il prêt à livrer ses secrets? Développements actuels relatifs à la détermination du sexe dans l'oeuf. *Aviculture Suisse* 11/18, 11-12.

Bartels, T., K. Cramer, R. Galli, E. Koch, G. Preusse, C. Schnabel, G. Steiner & M.-E. Krautwald-Junghanns (2018): Aus und vorbei mit dem Überraschungsei? Aktuelle Entwicklung bei der Geschlechtsbestimmung im Hühnerei. *Schweizer Geflügelzeitung* 11/18, 15-17.

Proceedings von wissenschaftlichen Tagungen

Krautwald-Junghanns M.-E., T. Bartels, K. Cramer, B. Fischer, A. Förster, R. Galli, G. Preusse, E. Koch, S. Meissner, R. Preisinger, C. Schnabel & G. Steiner (2018): Einstieg aus dem Töten von Eintagsküken? Stand der Dinge bei der Geschlechtsbestimmung im Hühnerei. Proc. 9. Leipziger Tierärztekongress (Leipziger Blaue Hefte), Leipzig, 18.01.-20.01.2018, Band 3, pp. 315-318.

Krautwald-Junghanns, T. Bartels, B. Fischer, A. Förster, R. Galli, F. Kremer, G. Preusse & G. Steiner (2017): In ovo sex determination in the domestic chicken by near-infrared Raman spectroscopy. Proc. XXth World Veterinary Poultry Association Congress, Edinburgh, 04.09.-08.09 2017, p. 220.

Krautwald-Junghanns M.-E., T. Bartels, K. Cramer, B. Fischer, A. Förster, R. Galli, M. Huchler, G. Preusse, S. Meissner, R. Preisinger & G. Steiner (2015): Anwendungsorientierte Untersuchungen zur in ovo-Geschlechtsbestimmung beim Haushuhn. 22. FREILAND-Tagung/28. IGN-Tagung, Wien (Österreich), 24.09.2015, pp. 15-18.

Krautwald-Junghanns M.-E., T. Bartels, K. Cramer, B. Fischer, A. Förster, R. Galli, M. Huchler, G. Preusse, S. Meissner, R. Preisinger & G. Steiner (2015): Spektroskopische Geschlechtsbestimmung im Hühnerei. Proc. 89. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten, Hannover, 05.-06.11.2015, 17-19. Verlag der DVG-Service GmbH, Gießen. ISBN 978-3-86345-118-9.

Eine weitere Veröffentlichung zur spektroskopischen Geschlechtsbestimmung am stumpfen Eipol ist in Bearbeitung und soll zeitnah eingereicht werden.

Patentschriften

Verfahren zur Klassifizierung von Spektren von Objekten mit komplexem Informationsgehalt,
DE 102016011348.0; Anmeldung: 16.09.2016; G. Steiner, G. Preuße, R. Galli, E. Koch, C.
Schnabel, J. Preuße, TU Dresden

Verfahren zur Positionierung einer Messstelle an mindestens einem Blut führenden Gefäß
eines geöffneten Vogeleies zur nachfolgenden Geschlechtsbestimmung des Vogeleies;
DE 102016013155.1; Anmeldung: 26.10.2016; G. Preuße, G. Steiner, R. Galli, E. Koch, C.
Schnabel, TU Dresden

Verfahren und Vorrichtung zur Einstellung des Laserfokus eines Anregungslasers in blut-
durchflossenen Gefäßen für optische Messungen zur Bestimmung des Geschlechtes von
Vogeleiern;
DE 102016005974.5, Anmeldung 13.05.2016; C. Schart, E. Koch, G. Steiner, G. Preuße, C.
Schnabel, R. Galli, T. Dimter; TU Dresden, HTW Dresden

Verfahren und Vorrichtung zur optischen in-ovo Geschlechtsbestimmung von befruchteten
und bebrüteten Vogeleiern;
DE 102016004051.3, Anmeldung: 04.04.2016; G. Steiner, G. Preuße, R. Galli, E. Koch; TU
Dresden

III. Erfolgskontrollbericht

III.1 Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen

Das Projekt wurde im Rahmen der Innovationsförderung der BLE auf dem Gebiet Tierhaltung / Geflügel durch die Deutsche Innovationspartnerschaft Agrar (DIP) gefördert, welche die Umsetzung von Innovationsprojekten in vermarktungsfähige Produkte unterstützt. Mit der Entwicklung eines praxisreifen Verfahrens zur spektroskopischen Geschlechtsbestimmung am Tag 3,5 der Inkubation wurden die förderpolitischen Ziele des Programmes erreicht.

III.2 Wissenschaftlich-technische Ergebnisse des Vorhabens, erreichte Nebenergebnisse und gesammelte wesentlichen Erfahrungen

Im Projektzeitraum wurde von der AG KSM der TU Dresden erstmals die Geschlechtsspezifik der Fluoreszenzsignale des embryonalen Blutes beschrieben. Dabei ist noch ungeklärt, welchen Blutstrukturen die geschlechtsspezifischen Merkmale zuzuordnen sind. Die Klassifizierungsgenauigkeit der spektroskopischen Geschlechtsbestimmung lag typischerweise bei 95-98%. Beobachtungen an aufgezogenen fehlklassifizierten Hühnern legen die Vermutung nahe, dass einzelne Tiere Abweichungen zwischen ihrem genetisch definierten und ihrem biochemischen Geschlecht aufweisen.

III.3 Fortschreitung des Verwertungsplans

III.3.1. Erfindungen/Schutzrechte

Seitens der Universität Dresden wurden im Berichtszeitraum folgende mit dem Projekt in Zusammenhang stehende Erfindungen / Schutzrechte angemeldet bzw. erteilt:

Verfahren zur Klassifizierung von Spektren von Objekten mit komplexem Informationsgehalt

DE 102016011348.0; Anmeldung: 16.09.2016; G. Steiner, G. Preuße, R. Galli, E. Koch, C. Schnabel, J. Preuße, TU Dresden

Verfahren zur Positionierung einer Messstelle an mindestens einem Blut führenden Gefäß eines geöffneten Vorgeleies zur nachfolgenden Geschlechtsbestimmung des Vorgeleies;

DE 102016013155.1; Anmeldung: 26.10.2016; G. Preuße, G. Steiner, R. Galli, E. Koch, C. Schnabel, TU Dresden

Verfahren und Vorrichtung zur Einstellung des Laserfokus eines Anregungslasers in blutdurchflossenen Gefäßen für optische Messungen zur Bestimmung des Geschlechtes von Vogeleiern;

DE 102016005974.5, Anmeldung 13.05.2016; C. Schart, E. Koch, G. Steiner, G. Preuße, C. Schnabel, R. Galli, T. Dimter; TU Dresden, HTW Dresden

Verfahren und Vorrichtung zur optischen in-ovo Geschlechtsbestimmung von befruchteten und bebrüteten Vogeleiern;

DE 102016004051.3, Anmeldung: 04.04.2016; G. Steiner, G. Preuße, R. Galli, E. Koch; TU Dresden

III.3.2. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Die Vermeidung der routinemäßigen Tötung männlicher Eintagsküken im Rahmen der Legehennenvermehrung ist mittlerweile zu einem Anliegen von erheblicher ethischer, rechtlicher und gesellschaftspolitischer Tragweite geworden. Allein in Deutschland werden im Rahmen der Legehennenvermehrung jährlich ca. 45 Millionen männlichen Nachkommen getötet und überwiegend als „Futterküken“ vermarktet. Weltweit wird der Bestand an Legehennen gegenwärtig auf ca. 7 Milliarden Individuen geschätzt, die den derzeitigen Weltbedarf von etwa 68,3 Mio. Tonnen Eiern pro Jahr produzieren. Auf internationaler Ebene könnte der Einsatz des entwickelten Verfahrens in der Praxis künftig zur Vermeidung der Tötung einer entsprechenden Anzahl männlicher Legehybriden führen und damit einen wertvollen Beitrag zum Tierschutz in der Nutzgeflügelhaltung liefern.

Aus wirtschaftlicher Sicht ist die Einsparung von Brutkapazitäten nach Aussortierung der nicht entwicklungsfähigen bzw. der als „männlich“ identifizierten Bruteier erwähnenswert. Bruteier, bei denen die Bebrütung nach Einlegen in den Brutapparat vor dem Schlupf der Küken abgebrochen wurde, können ferner im Einklang mit den jeweils geltenden rechtlichen Bestimmungen als „tierische Nebenprodukte der Kategorie III“ einer Verwertung zugeführt werden, beispielsweise zur Herstellung von Futtermitteln, Dünge- und Bodenverbesserungsmitteln, Kompost und Biogas sowie Folgeprodukten (z. B. kosmetische Mittel, Medizinprodukte, In-vitro-Diagnostika und (Tier-)Arzneimittel).

III.3.3. Wissenschaftliche und technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Die Agri Advanced Technologies GmbH (AAT, Hogenbögen 1, D-49429 Visbek) hat eigenen Angaben zufolge bereits eine technische Lösung entwickelt, die auf den Ergebnissen der

Grundlagenforschung zur spektroskopischen Ermittlung des Geschlechts aufbaut und nutzt dabei das Praxis-Know-how von Brüteriefachleuten aus den Schwesterunternehmen der EW Group. In umfangreichen Voruntersuchungen konnten die Funktionalität und die Vorteile dieses Ansatzes im Hinblick auf die Genauigkeit der Bestimmung und des Schlupfergebnisses eindeutig nachgewiesen werden. Die Bestimmung des Geschlechts erfolgt mit Hilfe eines optischen Messverfahrens am vierten Bruttag. Dabei wird zuerst die Luftkammer im Ei detektiert, die Schale dann mit einem CO₂-Laser perforiert und der Schalendeckel abgehoben. Nachdem das Geschlecht bestimmt wurde, wird die Schale wieder verschlossen. Die als weiblich eingestuften Eier werden zurück in den Brutschrank gebracht und die männlichen Eier für die Weiterverarbeitung in der Industrie genutzt. Der von der AAT entwickelte Prototyp zur vollautomatisierten spektroskopischen Geschlechtsbestimmung im Ei befindet sich momentan in der Testphase unter Praxisbedingungen. Hierbei hat sich gezeigt, dass bei der Entwicklung einer solch vollkommen neuen Technologie auch Probleme und Herausforderungen auftreten, die vorher nicht absehbar waren. Da AAT sichergehen muss, dass die Anlage bei Marktreife absolut zuverlässig und stabil läuft, wird aktuell ein umfassender Stresstest der Anlage und seiner Komponenten durchgeführt. Die dabei immer wieder notwendigen technischen Anpassungen werden noch einige Zeit in Anspruch nehmen. Deshalb kann zurzeit noch kein konkretes Einführungsdatum genannt werden. [Quelle: <https://www.agri-at.com> (abgerufen am 27.06.2019)].

Nach unserem Wissen baut die Anlage der AAT GmbH auf den im Projekt erarbeiteten Grundlagen auf, besitzt aber nicht das für die spektroskopische Geschlechtsbestimmung notwendige detaillierte Expertenwissen. Unter Anderem fehlen ihr u. E. die für den Praxiseinsatz wichtigen Erkenntnisse aus der letzten Projektphase, welche erst nach patentrechtlicher Einigung übertragen werden können.

III.3.4. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw. nächste innovatorische Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der Ergebnisse

Eine wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit des Forschungsprojektes wird schwerpunktmäßig in der Weiterentwicklung der Methode hin zu einer Geschlechtsbestimmung durch die unversehrte Eischale gesehen (vgl. Punkt II.5). Das Ei müsste dann nicht mehr aufwändig geöffnet und verschlossen werden. Aufbauend auf den über mehrere Jahre gewonnenen Kenntnissen, wo und wie das Geschlecht im Ei codiert ist, sollten spektrosko-

pische Methoden nunmehr so eingesetzt werden, dass das Geschlecht auch durch die intakte Eischale bestimmt werden kann.

Ziel künftiger Forschungsarbeiten sollte es sein, diese Methodik zu verifizieren und rasch und effektiv für den Einsatz in der Brüterei Praxis zu adaptieren, um damit einen wichtigen Beitrag für die Verbesserung des Tierwohls in der Legehennenhaltung leisten zu können. Die Automatisierung des Prozesses wird dabei als große Herausforderung eingeschätzt, da Bruteier keine genormten Industrieprodukte sind, sondern eine hohe Variabilität aufweisen (Schalenfarbe, Kalkschalendicke, Entwicklungszustand, Verlauf der Gefäße etc.). Praxistests sollten auch Aufschluss über die Fehlerrate im praktischen Einsatz liefern, da die aus fehlsortierten, als „weiblich“ eingestuften Eiern schlüpfenden Hähne aufgezogen und wirtschaftlich verwertet werden müssen.

Ein weiterer Aspekt sind Untersuchungen zur Übertragbarkeit der erarbeiteten Methoden auf andere Nutzgeflügelarten, beispielsweise Hastruthühner (*Meleagris gallopavo* f. dom.), Japanische Wachteln (*Coturnix japonica* f. dom.), Hausenten (*Anas platyrhynchos* f. dom.) und Moschusenten (*Cairina moschata* f. dom.).

III.4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

In mehreren Projektbesprechungen hatte die Evonta Technology GmbH über die erfolgreiche Umsetzung der Eiöffnung und des Eiverschlusses berichtet (s. u. Protokoll des Projekttreffens vom 27.07.2016). Daher wurde seitens der Klinik für Vögel und Reptilien ebenso wie seitens der Kooperationspartner der TU Dresden davon ausgegangen, dass das automatische Öffnen entsprechend den Anforderungen technisch realisiert werden kann und das entsprechende Modul soweit auch existiert. In einem Großbrutversuch (02.- 05.05.2017) in der Brüterei Cuxhaven-Altenwalde sowie einem nachfolgend durchgeführten Praxistest am 20.06.2017 in den Laboren der Abt. KSM der TU Dresden stellte sich jedoch heraus, dass das automatische Öffnen in keiner Weise den Anforderungen genügte. In diesen Praxistests wurde ein Teil der Eier durch das Öffnungsmodul nur unvollständig oder gar nicht geöffnet. Bei anderen Eiern wurde der Schalenrand massiv beschädigt, was einen dichten Verschluss der Eier verhindert oder Embryonen beim Öffnen so massiv verletzt, dass sie abstarben. Das nahezu senkrechte und schnelle Hochheben der Eikappe führte zwangsläufig zu dem unerwünschten „Mitziehen“ und Austreten von Eiklar. Allein dadurch waren etwa 2/3 der Eier nicht weiter nutzbar. Mehrfach wurde seitens der Klinik für Vögel und Reptilien und der Abtl. KSM der TU Dresden darauf

hingewiesen, dass die Eikappe schräg abgehoben werden muss. Nur so kann der Eiweißfilm abreißen und wird nicht mit aus dem Ei herausgehoben. Seitens der Evonta Technology GmbH wurde dem Konsortium zugesichert, dass das Problem bis Ende September 2017 gelöst werde. Im weiteren Verlauf konnte jedoch nicht bestätigt werden, dass die genannten Probleme behoben werden konnten. Im Rahmen eines Projekttreffens am 27.03.2018 in Leipzig wurde dann seitens der Evonta Technology GmbH mitgeteilt, dass, abweichend von bisherigen Äußerungen zum Projektstand, seit Juni 2017 keine weiterführenden Arbeiten an den Einzelmodulen im Rahmen des Projektes erbracht worden seien. Damit konnten auch jene Arbeitspakete, für deren Bearbeitung eine Vollautomatisierung der Prozesse des Laserns, des Öffnens und des Verschließens notwendig sind, infolge der Nichtverfügbarkeit funktionstüchtiger Module im Berichtszeitraum nicht bearbeitet werden. Seitens der BLE wurde mit Änderungsbescheid vom 12.06.2018 dann bestätigt, dass die Anpassungen der Module „Lasern“, „Öffnen“ und „Verschließen“ des Projektpartners EVONTA Technology GmbH entfallen und damit unmittelbar verknüpfte Tätigkeiten der Projektpartner obsolet werden.

III.5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Die Art des Vorhabens lässt für diesen Abschnitt keine Angaben zu.

III.6 Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung

Alle im Rahmen der Kooperation mit den Projektpartnern erforderlichen Tätigkeiten konnten von der Arbeitsgruppe KSM im Projektzeitraum fristgerecht und ohne Überschreitung des veranschlagten Kostenrahmens durchgeführt werden.

Im Weiteren wird auf die Abschnitte I und II des Schlussberichtes verwiesen.

IV Kurzfassung

Etablierung spektroskopischer Verfahren für eine praxistaugliche in ovo-Geschlechtsbestimmung beim Haushuhn (*Gallus gallus* f. dom.)

In einem Verbundprojekt der TU Dresden und der Universität Leipzig wurde ein praxistaugliches Verfahren zur Geschlechtsbestimmung im Hühnerei entwickelt. Die mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeführte Geschlechtsbestimmung erfolgt kontaktlos an 3,5 Tage bebrüteten Eiern weit vor dem Auftreten der Empfindungsfähigkeit der Embryonen. Informationsträger für die Geschlechtsdiagnose ist Blut des embryonalen Blutgefäßsystems, dessen Rückstreuungsspektren geschlechtsspezifische Unterschiede aufweisen. Für die Untersuchung wird ein optischer Zugang am stumpfen Eipol geschaffen. Nach der spektroskopischen in-ovo Geschlechtsbestimmung werden die als weiblich identifizierten Eier wieder versiegelt, die Schlupfraten bleiben unbeeinflusst. Mittels eines patentierten multiplen Klassifikationsalgorithmus ergibt sich eine Prognosegenauigkeit > 95%.

Die AAT GmbH (EW Group) hat nach eigenen Angaben eine technische Lösung entwickelt, die auf den Ergebnissen der oben beschriebenen Grundlagenforschung aufbaut. Die Vorteile dieses Ansatzes im Hinblick auf Funktionalität und Genauigkeit der Bestimmung wurden in umfangreichen Untersuchungen nachgewiesen.

Establishment of practicable spectroscopic techniques for *in ovo* gender determination of domestic fowl in (*Gallus gallus* f. dom.)

In a joint project of the TU Dresden and the University of Leipzig, a practical method for sex determination in hen's eggs was developed. Sex determination by fluorescence spectroscopy is carried out contactlessly on eggs incubated for 3. 5 days long before the embryos'; sensitivity occurs. The information carrier for gender diagnosis is the blood of the embryonic blood vessel system, the backscatter spectra of which show gender-specific differences. An optical access to the egg blunt pole is created for the measurement. After the spectroscopic in-ovo sex determination, the eggs identified as female are sealed again, the hatching rates remain unaffected. By means of a patented multiple classification algorithm, a forecast accuracy of > 95% results.

The AAT GmbH (EW Group) has developed a technical solution which is based on the results of the basic research described above. The advantages of this approach in terms of functionality and accuracy of determination have been demonstrated in extensive investigations.

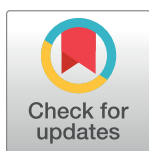
RESEARCH ARTICLE

Sexing of chicken eggs by fluorescence and Raman spectroscopy through the shell membrane

Roberta Galli^{1*}, Grit Preusse¹, Christian Schnabel¹, Thomas Bartels², Kerstin Cramer², Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns², Edmund Koch¹, Gerald Steiner^{1,3*}

1 Clinical Sensing and Monitoring, Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Faculty of Medicine, TU Dresden, Dresden, Germany, **2** Clinic for Birds and Reptiles, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany, **3** Faculty of Physics, Vilnius University, Vilnius, Lithuania

* roberta.galli@tu-dresden.de (RG); gerald.steiner@tu-dresden.de (GS)



Abstract

In order to provide an alternative to day-old chick culling in the layer hatcheries, a noninvasive method for egg sexing is required at an early stage of incubation before onset of embryo sensitivity. Fluorescence and Raman spectroscopy of blood offers the potential for precise and contactless in ovo sex determination of the domestic chicken (*Gallus gallus* f. dom.) eggs already during the fourth incubation day. However, such kind of optical spectroscopy requires a window in the egg shell, is thus invasive to the embryo and leads to decreased hatching rates. Here, we show that near infrared Raman and fluorescence spectroscopy can be performed on perfused extraembryonic vessels while leaving the inner egg shell membrane intact. Sparing the shell membrane makes the measurement minimally invasive, so that the sexing procedure does not affect hatching rates. We analyze the effect of the membrane above the vessels on fluorescence signal intensity and on Raman spectrum of blood, and propose a correction method to compensate for it. After compensation, we attain a correct sexing rate above 90% by applying supervised classification of spectra. Therefore, this approach offers the best premises towards practical deployment in the hatcheries.

OPEN ACCESS

Citation: Galli R, Preusse G, Schnabel C, Bartels T, Cramer K, Krautwald-Junghanns M-E, et al. (2018) Sexing of chicken eggs by fluorescence and Raman spectroscopy through the shell membrane. PLoS ONE 13(2): e0192554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554>

Editor: Yogendra Kumar Mishra, Institute of Materials Science, GERMANY

Received: October 5, 2017

Accepted: January 25, 2018

Published: February 23, 2018

Copyright: © 2018 Galli et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The project was supported by funding from the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL, www.bmel.de), based on a decision by the Parliament of the Federal Republic of Germany via the Federal Office for Agriculture and Food (BLE, www.ble.de), under an innovation support program (grant n. 2813IP003 and 2813IP004). The funders had no role in study design, data collection and

Introduction

The increasing specialization of chicken lines for either egg production or meat yield performance has made the male layers worthless, so that the freshly hatched cockerels are immediately eliminated. Several approaches of chicken egg sexing have been proposed in the attempt to solve the dilemma between economy and ethics by providing an alternative to day-old chick culling in layer hatcheries.

Both noninvasive and invasive sexing methods have been explored in the recent years. Among the noninvasive ones, reflectance spectroscopy provided good sexing results at mid incubation periods [1], while hyperspectral imaging enabled reliable sexing limited to layer strains with sex-specific feather color at mid incubation periods [2]. Other totally noninvasive sexing methods based on egg shape [3] or odor [4] were not yet practically applied. Among the

analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: Patents and patent applications on in ovo sexing by Raman and fluorescence spectroscopy (DE20141010150, WO2015DE00342 and US9835560: Method and device for the Raman spectroscopic, in ovo sex determination of fertilised and incubated birds' eggs; DE102016004051 and WO2017174337, Verfahren und Vorrichtung zur optischen in-ovo Geschlechtsbestimmung von befruchteten und bebrüteten Vogeleiern). This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials. We do not have any other relevant declarations relating to employment, consultancy, patents, products in development or modified products etc.

invasive methods that require extraction of samples, molecular sexing proved to be simple and robust in laboratory conditions [5]. Measurement of hormones in egg fluids is also a robust and established method, but it can be applied only after day 9 of incubation [6–8]. Infrared absorption spectroscopy provided the sex of unincubated eggs by analyzing the blastoderm cells [9]. However, this method could not be exploited because shell windowing of the unincubated egg strongly affects hatching rate and chick health [10,11].

We recently demonstrated that near infrared fluorescence and Raman spectroscopy (hereinafter referred to as optical spectroscopy) performed during the fourth day of incubation provides precise in ovo sexing based on differences in the composition of embryonic blood [12,13]. Although the spectroscopic analysis itself demonstrated to be totally damage-free, the method qualified nevertheless as invasive due to the need of windowing the egg shell to optically access the extraembryonic blood vessels, which led to some reduction of hatching rate (~ 10%) [12]. The measurements were performed at the pointed pole, where egg membranes are tightly adherent to the shell. Therefore, also the shell membranes were removed together with the shell by lifting of the window, directly exposing the embryo to the external environment.

It is widely accepted that the egg shell membranes, and not the shell, provide main protection against bacterial penetration [14]. The inner shell membrane, constituted by a dense mesh of interwoven fibrous proteins plus a variety of other proteins and peptides associated with protective functions [15], is a more effective barrier than the outer shell membrane [16]. In fact, only the thick mineralized shell constitutes an optical barrier to the spectroscopic measurements, while the underlying membranes are thin enough to be transparent. In this study, we show that in ovo sexing by optical spectroscopy can be performed without removing the inner shell membrane, thus avoiding negative effects on hatching rates.

Methods

Ethics statement

According to German animal welfare legislation, no approval was necessary to perform the experiments on embryonated chicken eggs. Egg shell opening and optical measurements were performed on embryos in early stages of development (between E3 and E4), before the neural tube has developed into a functional brain and the embryo has developed sensitivity to pain [17,18]. No experiments took place at later developmental stages. Hatched chicks were only subjected to visual observation after hatching, and then transferred to a farm. Maximal care was used in order to avoid distress to animals.

Egg handling

Fertilized eggs of a commercial white layer strain of the domestic chicken (*Gallus gallus* f. dom.) (LSL—Lohmann Selected Leghorn) were used. They were obtained from Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven, Germany). The freshly laid eggs were inspected for any shell damage and then stored for max. 36 hours at approximately 14°C until start of the incubation. The incubation was performed in an automatic egg incubator (Favorit Olymp 192, Heka-Brutgeräte, Rietberg, Germany) at 37.8°C and a humidity of 53%, in vertical position with the blunt pole upward. A $\pm 45^\circ$ tilting at an interval of 3 h was applied during the incubation time.

At day 3.5 (i.e., 84 h), the eggs were subjected to the measurement. The egg shells were windowed using a 30 W CO₂ laser (Firestar v30, Synrad, Mukilteo, Washington, USA) equipped with scanning head (FH Flyer, Synrad, Mukilteo, Washington, USA). The shells were laser-scribed at the blunt pole along a round path of 15 mm diameter. The shell window was gently lifted using a scalpel. The inner shell membrane was left intact. After measurement, embryonic

tissue samples were isolated for subsequent molecular sexing, or the shell windows were closed using a biocompatible adhesive tape (Leukosilk, BNS Medical GmbH, Hamburg, Germany) and further incubated until hatching. Visual assessment of health status and sex was performed on hatched chicks. LSL day-old chicks are sexable by discrimination of wing feather growth. In female LSL chicks primary wing feathers are longer than the covert feathers (“fast feathering”), while in male chicks primary and covert feathers show the same length (“slow feathering”) at hatch.

Reference sexing was obtained with genetic analysis on embryonic tissue based on polymerase chain reaction (PCR), as described elsewhere [13].

Optical coherence tomography

A spectral domain optical coherence tomography (OCT) system [19] with center wavelength of 880 nm and bandwidth of 130 nm was used with an A-scan rate of 12 kHz. The system allows the simultaneous acquisition of 3D OCT and microscopy camera images by using the same beam path. For OCT, the near-infrared light from a superluminescent diode (Superlum, Russia) is guided to the scanner head containing a Michelson interferometer. The incoming light is separated by a beam splitter into a sample beam and a reference beam. The sample beam is rastered in x and y directions over the sample by two galvanometer scanners (Cambridge Technology Inc., USA). The backscattered and reflected light from different sample depth is guided back to the beam splitter and superimposed with the reference beam. This interference signal is spectrally resolved by a diffraction grating and measured by a line-detector (Teledyne DALSA Inc., Canada). The depth-dependent information is calculated by Fast Fourier Transformation and the logarithm of the intensity is displayed on an 8 bit gray scale. To acquire a 2D image of a sample, one galvanometer scanner is rotated to measure adjacent A-scans resulting in cross-sectional images. By deflecting the second galvanometer scanner, adjacent B-scans are acquired forming the 3D OCT image. The axial and lateral resolution is 6.5 μm in air.

Optical spectroscopy

In ovo optical spectroscopy was performed with a spectrometer RamanRxn (Kaiser Optical Systems Inc., Ann Arbor, USA). The excitation was obtained with a diode laser emitting at a wavelength of 785 nm (Invictus 785-nm NIR, Kaiser Optical Systems Inc., Ann Arbor, USA). A fiber optic probe (MR-Probe-785, Kaiser Optical Systems Inc., Ann Arbor, USA) was used in the experiments. The excitation fiber had a core diameter of 62.5 μm and the collection fiber of 100 μm . The fiber probe was coupled to a self-built microscopy system enabling coaxial vision. Further details on the system are reported elsewhere [13]. A microscope objective 20 $\times$ /0.4NA Plan Apo NIR (Mitutoyo Corp., Kanagawa, Japan) was used to focalize the laser beam in a spot with a diameter of $\sim 55 \mu\text{m}$. The measured laser power in the focus was 160 mW. The backscattered light was collected in reflection mode. In order to maximize the visibility of perfused blood vessels, illumination with green LEDs was employed. Blood vessels with diameters larger than 100 μm were manually chosen for the measurement. Total acquisition time was set to 40 s (20 accumulations of 2 s). The acquired spectral range was 150–3250 cm^{-1} and the spectral resolution was approximately 4 cm^{-1} .

Scattering spectra of isolated native inner shell membranes were acquired with a Fourier-transform infrared spectrometer Vertex 70 (Bruker GmbH, Leipzig, Germany) equipped with a gold-coated integration sphere and InGaAs detector. The spectral resolution was 4 cm^{-1} in the spectral range 4000–15000 cm^{-1} . The membranes were placed on a light trap, to avoid background reflection. Spectra were acquired using 200 scans.

Data analyses

OCT datacubes were visualized and analyzed in Fiji [20]. The stack reslice function was used to generate cross sections and top views along user defined lines.

Spectroscopic data were analyzed using the Matlab package (MathWorks Inc., Natick, USA). The intensity of the fluorescence was calculated as sum area under the spectra in the range 500–2800 cm^{-1} . Principal component analysis (PCA) was performed on the raw spectra by using the Matlab function “princomp”. The classification of spectra was carried out by an in-house written algorithm described elsewhere [12]. Briefly, a combination of two algorithms was employed to seek features to partition the spectra cleanly into two groups according to the sex. The first algorithm is a genetic optimal region selection routine. This algorithm takes as input the so called training spectra (in the present case, 40 spectra for each class) and their designation to female or male, respectively. With this information, the algorithm identifies a set of spectral subregions that, taken together, serve as a basis to group the spectra according to the sex. The classification was then carried out using a second algorithm which employs non-linear discriminant analysis to optimally partition into groups the spectra re-expressed as spectral subregions.

Statistics were calculated with Prism 6.0 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

At day 3.5 of incubation of the chicken egg, the embryo is about 5 mm long and possesses a primitive blood circulation enabling gas exchange through an extraembryonic vascularized area of the yolk sac. This vascularized area is referred to as vitelline circulation and has a diameter of about 3 cm. When the egg is in an upright position with the blunt pole facing upwards, the embryo in the center of the vascularized area is localized on top of the yolk, below the air cell at the blunt pole. The air cell is localized between the inner shell membrane, which is directly in contact with the albumen, and the outer shell membrane, which is adherent to the shell (Fig 1A). When a window in the shell is produced at the blunt pole, the outer membrane is removed together with the shell, while the inner membrane remains undamaged. The inner membrane is so thin that the embryo with the vitelline circulation is visible through the membrane (Fig 1B), thereby enabling identification of the vessels under a Raman microscope, the irradiation of the circulating blood with a near infrared laser and the acquisition of the back-scattered spectrum.

The morphology of egg structures beneath the membrane, and relevant for the optical spectroscopic measurement, was studied by OCT and is exemplarily shown in Fig 1C. In the OCT image plane about 100 μm below the surface, the blood vessel network is clearly visible. In the cross-section OCT image, the inner shell membrane is visible as a bright structure on the surface. The blood vessels are localized immediately under the membrane. The thickness of the inner shell membrane measured on OCT images of 20 eggs was $22 \pm 3 \mu\text{m}$ (mean $\pm$ SD, min. 18 μm , max. 27 μm). This is in substantial agreement with the reported value of 20 μm [21].

The spectra excited with near infrared laser radiation and acquired in ovo from blood vessels are composed by Raman bands superimposed to a broad fluorescence. As shown in Fig 2A, the fluorescence intensity of female eggs ($n = 91$) is generally lower compared to the fluorescence intensity of male eggs ($n = 68$). Median intensity values are significantly different, although a large overlap of fluorescence intensities exists, as shown in Fig 2B (data available in S1 Table). This result is similar to what we reported in former studies performed on the pointed pole using the same excitation and acquisition parameters [13]. However, due to scattering effects on the membrane, the intensity is reduced compared to the analogous experiments performed at the pointed pole.

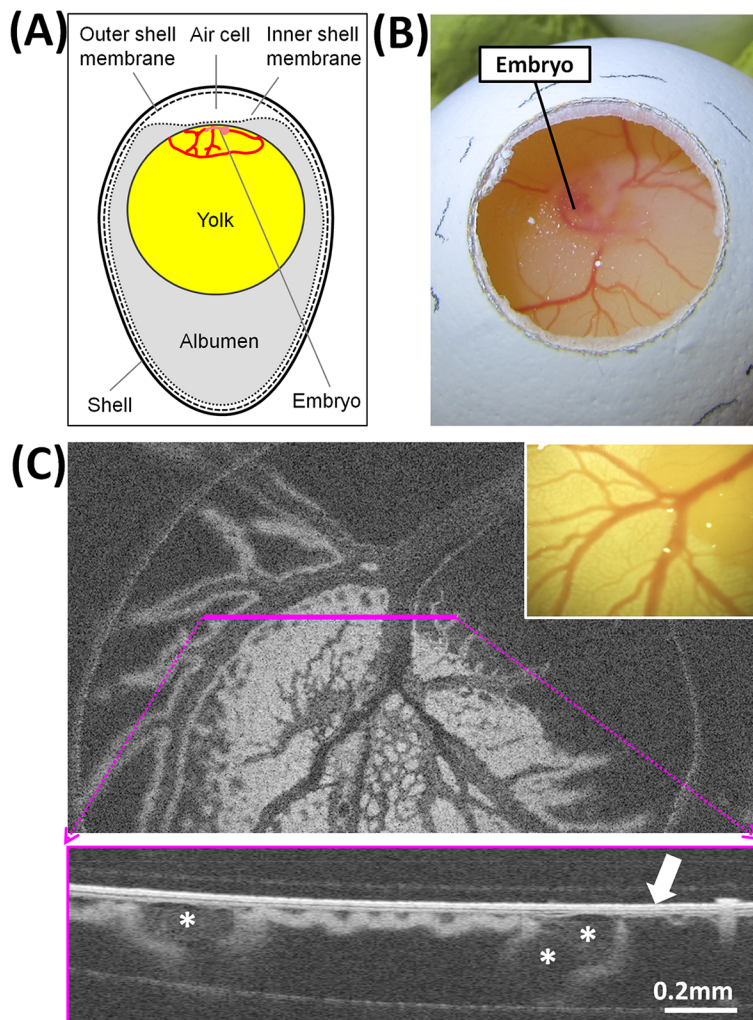


Fig 1. Structure of a chicken egg at day 3.5 of incubation. A: schema of the structures. B: embryo and extraembryonic vessels made accessible by opening the eggshell at the blunt pole. C: OCT image of extraembryonic vessels with corresponding camera image shown in the inset; in the cross-section OCT image acquired along the pink line, the arrow indicates the inner shell membrane and the asterisks indicate large blood vessels.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554.g001>

The inner shell membrane is an optical inhomogeneous scattering medium due to its fibrous structure (Fig 3A) and possesses Raman-active molecular transitions. The spectrum of an isolated inner membrane is shown on Fig 3B. It mainly contains Raman bands related to proteins: aromatic ring vibration of phenylalanine and tryptophan at 1003 cm^{-1} , amide III at 1250 cm^{-1} , CH_x vibrations of aliphatic side chains at 1310 , 1340 and 1449 cm^{-1} , C = C vibration (likely of tryptophan) at 1555 cm^{-1} , and amide I at 1665 cm^{-1} (all assignments based on [22,23]).

PCA was applied on the spectra acquired in ovo on perfused blood vessels in order to gain better insights in the different spectral contributions of blood and membrane, and highlight the relationship with the sex. The loading vectors and the scores of the first seven principal components (PC) are shown in Fig 4 and given in S2 Table. Higher components contain no meaningful bands and represent just noise.

PC #1 describes the mean spectrum. PC #2 represents a fluorescence centered at $\sim 1800\text{ cm}^{-1}$ ($\sim 910\text{ nm}$). PC #3 is characterized by Raman bands of proteins as seen in the spectrum

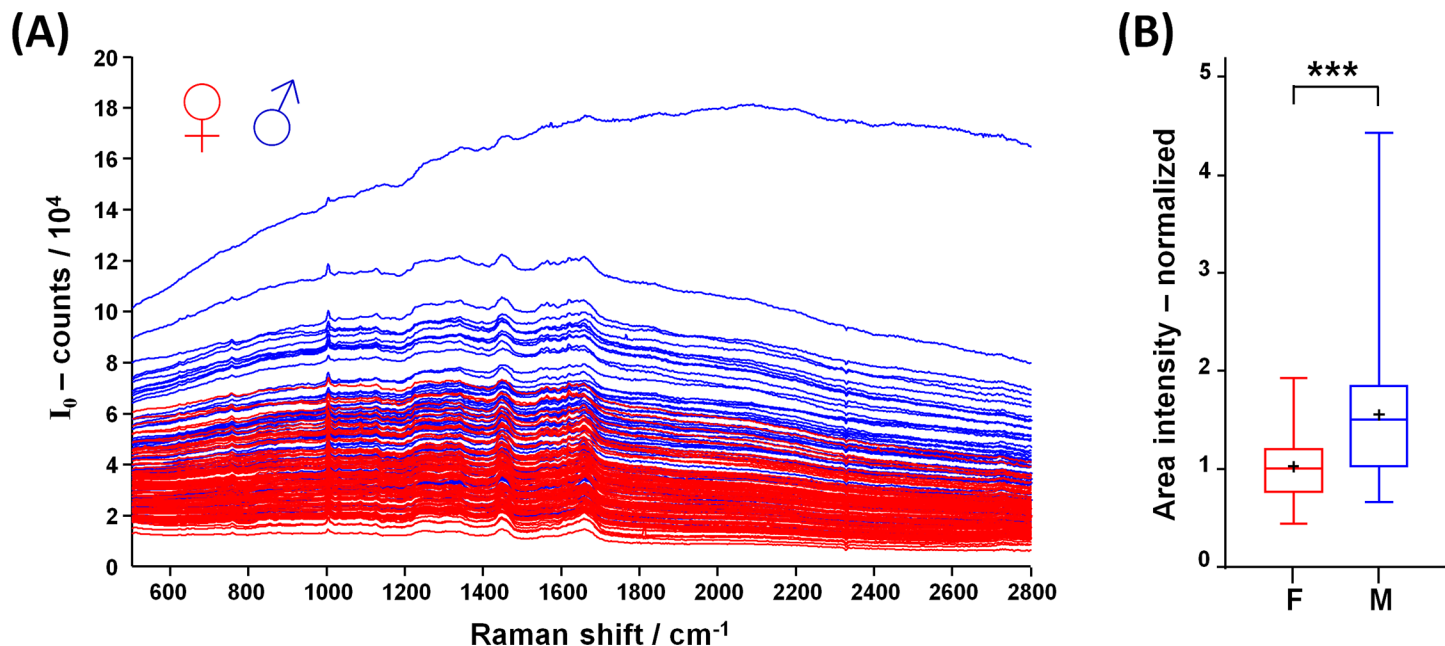


Fig 2. Spectra acquired in ovo through the intact inner shell membrane. A: spectra acquired on perfused blood vessels at the blunt pole of female (red) and male eggs (blue). B: Fluorescence intensity (line: median, cross: mean, box: 25th to 75th percentiles, whiskers: min-max; Mann-Whitney test, *** $p < 0.001$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554.g002>

of the membrane, to which it is very similar. PC #4 contains bands at 1084 cm^{-1} , 1447 cm^{-1} and 1638 cm^{-1} , which can be attributed to C-N, CH_x vibrations and amide I of alpha helix secondary structure, respectively. PC #5 displays mainly the phenylalanine band at 1003 cm^{-1} and the amide I band of beta sheet secondary structure at 1670 cm^{-1} . PC #6 contains bands at 754 cm^{-1} , 1563 cm^{-1} and 1620 cm^{-1} likely attributed to porphyrin, and 1225 cm^{-1} attributed to amide III. PC #7 contains bands attributed to different molecular vibrations of lipids and phospholipids: 870 cm^{-1} attributed to antisymmetric stretch vibration of choline group $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$,

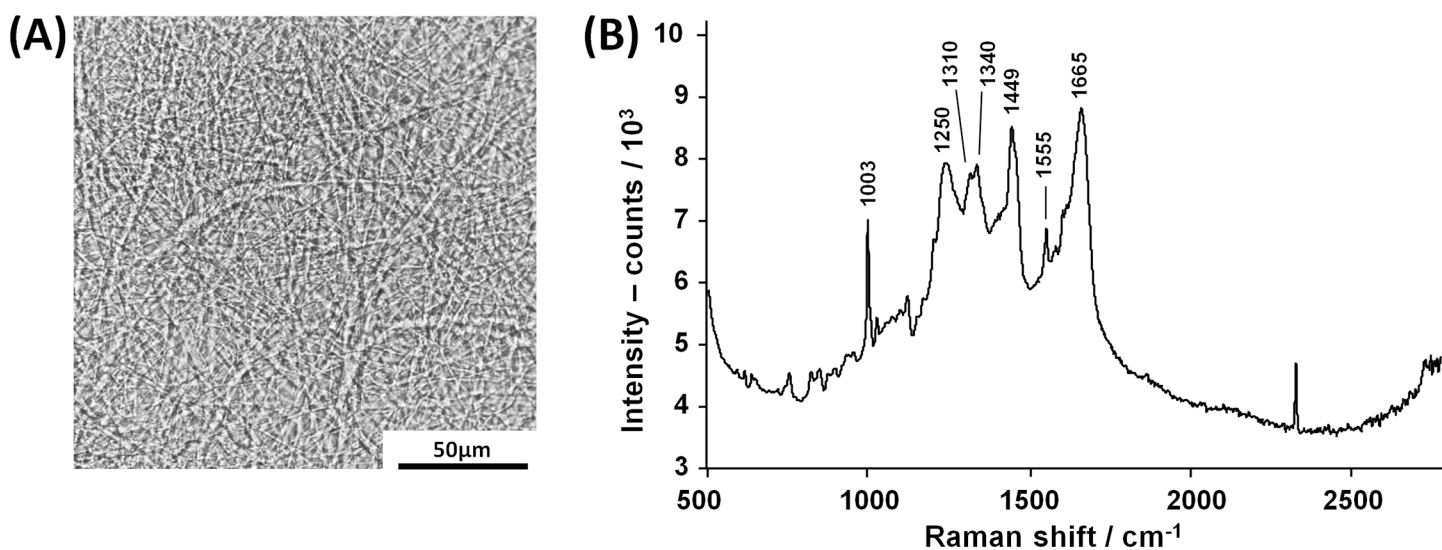


Fig 3. Inner shell membrane. A: Bright field microscopy picture. B: Raman spectrum of inner shell membrane, acquired on a native sample, freshly isolated from an egg.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554.g003>

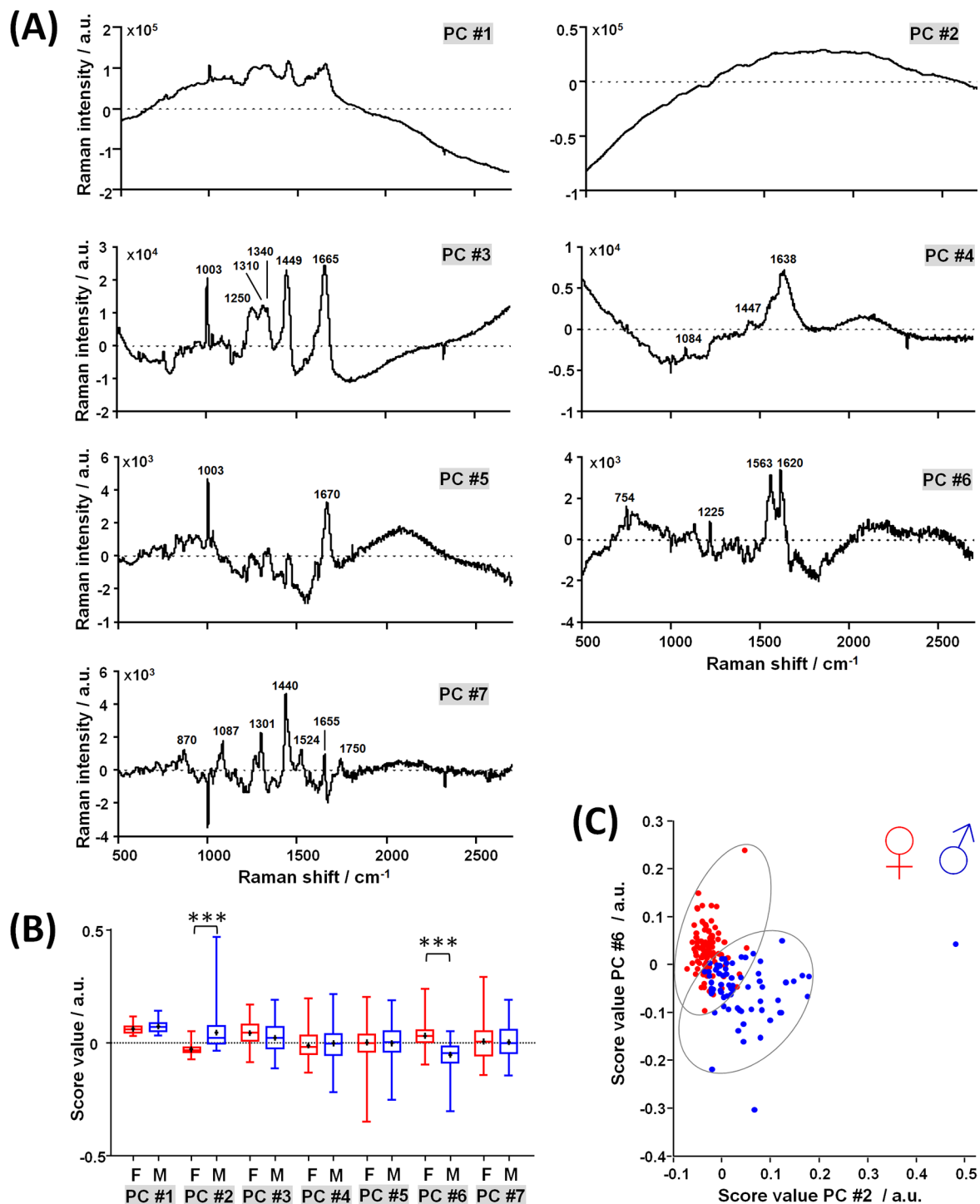


Fig 4. Principal component analysis of spectra acquired on perfused blood vessels at the egg blunt pole. **A:** Loading vectors; the position of Raman bands discussed in the text is indicated. **B:** Scores (line: median, cross: mean, box: 25th to 75th percentiles, whiskers: min-max; Mann-Whitney test, *** p < 0.001). **C:** Scatter plot of PC #6 vs. PC #2 scores.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554.g004>

1087 cm⁻¹ attributed to C-C and PO₄³⁻ stretching vibrations, 1301 cm⁻¹ attributed to CH deformation, 1440 cm⁻¹ attributed to CH₂ stretching vibration, 1524 cm⁻¹ and 1655 cm⁻¹ attributed

to C = C stretching vibrations, 1750 cm^{-1} attributed to C = O stretching vibration. All assignments were based on [22,23].

PC #2 and #6 describe variances that are significantly different between sexes (Mann-Whitney test, $p < 0.001$), supporting the idea that sex-related information are indeed contained in the spectra. However, data overlap is too large to enable separation between sexes with high accuracy (Fig 4C). PC #3 likely represents the contribution of the membrane. As it constitutes the third highest source of variance in the data, it suggests a strongly variable effect of the membrane on the acquired spectra, also in line with the variable membrane thickness measured with OCT.

The presence of the inner shell membrane has a double effect on the excited fluorescence and Raman signals of blood cells, which will be (i) scattered by the membrane leading to a reduced measured intensity and (ii) superimposed by Raman bands of the membrane, as depicted in Fig 5A. Moreover, the excitation laser beam is also partly backscattered by the membrane, contributing to decrease the Raman and fluorescence signal intensities of blood.

In order to ensure high accuracy of classification, the impact of the inner shell membrane on the spectra of blood cells has to be compensated. For instance, the variability of membrane thickness introduces scattering losses that variably affect the blood spectrum of each egg.

As shown in Fig 3B, a dominant band in the Raman spectra of the membrane is located at 1003 cm^{-1} , which originates from the aromatic amino acids phenylalanine and tryptophan. These amino acids are, beside glycine and proline, the most prevalent components in the inner egg shell membrane [24]. Furthermore, the results of PCA confirm that the intensity of this band is not related to the sex (i.e., it is not contained in the loading vectors of PC #2 and #6). Therefore, the intensity of this band in the spectra acquired on perfused blood vessels carries information on the thickness of the membrane. In order to exclude the background, a two-point linear baseline correction was performed on the spectra acquired on perfused blood vessels and on the spectrum of the membrane in the range $980\text{--}1020\text{ cm}^{-1}$, resulting in the spectra S_{BL} and S_{mBL} , respectively. The normalized thickness of the membrane d' was calculated as ratio of integral band intensities:

$$d' = \frac{\int_{980}^{1020} S_{BL}(v) dv}{\int_{980}^{1020} S_{mBL}(v) dv} \quad (1)$$

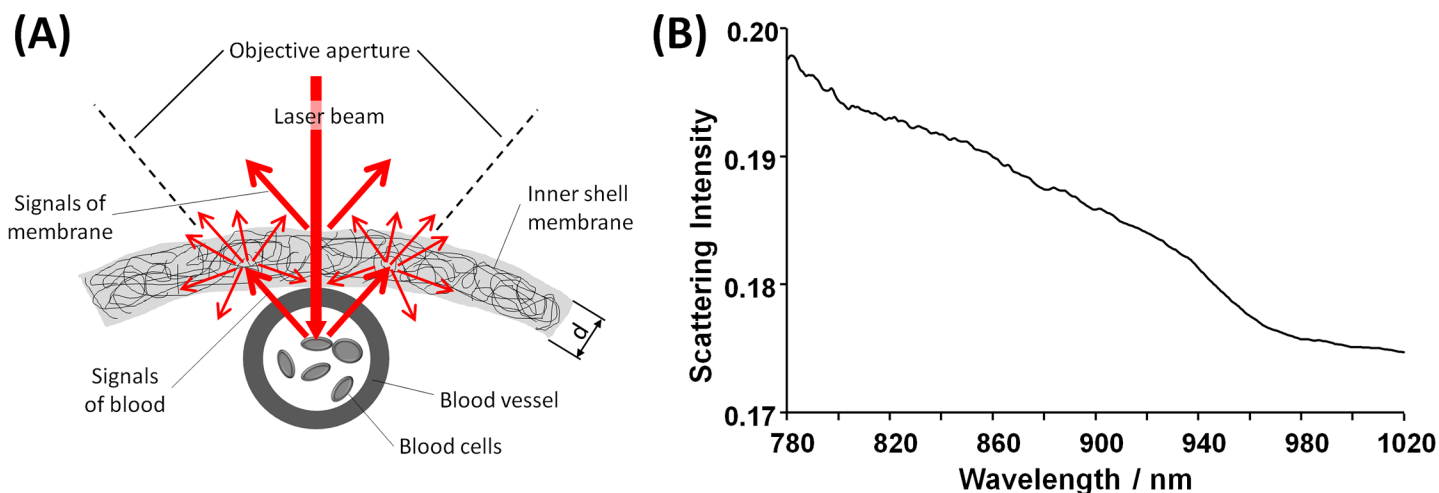


Fig 5. Scattering of the inner shell membrane. A: Schematic of the scattering effects. B: Scattering intensity of the inner shell membrane.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554.g005>

In order to compensate for Raman signals of the inner shell membrane, the spectra acquired in ovo were corrected as follows:

$$I' = (I_0 - S_R d') \quad (2)$$

where S_R is the Raman spectrum of the membrane (see Fig 3B) and I_0 the spectrum of embryonic blood.

A simple approach to compensate the scattering of the membrane is based on the theory of Kubelka and Munk [25]. As the absorption of the membrane is very low in the spectral range from 500 to 2800 cm^{-1} Raman shift (approx. 815 to 1005 nm), the theory can be simplified and the transmission expressed as [26]:

$$T = \frac{1}{1 + Sd} \quad (3)$$

where S is the scattering coefficient and d the thickness. Eq (3) provides an estimate for the relative changes of transmission losses T' due to scattering on membranes with different thickness, which is given by:

$$T'(\lambda) = \frac{1}{1 + S_m(\lambda)d'} \quad (4)$$

$S_m(\lambda)$ is the scattering intensity, which was measured on the freshly isolated membranes and is shown in Fig 5B in the spectral range of interest. Finally, the corrected spectral intensity I_c was retrieved as:

$$I_c = I' \cdot \frac{1}{T'(785)} \cdot \frac{1}{T'(\lambda)} \quad (5)$$

The term $T'(785)$ was obtained from Eq 4 using the scattering intensity S_m at 785 nm and compensates the relative variations due to scattering of the excitation beam, while the term $T'(\lambda)$ compensates for the wavelength-dependent relative variations due to scattering of the blood signals.

The corrected spectra are shown in Fig 6. The ratio between male and female median intensities is 2.3, which is higher than the ratio of 1.6 calculated from the raw data.

Finally, the corrected spectra were classified to retrieve the sex. A supervised classification was trained on 80 corrected spectra that were randomly selected (40 females and 40 males), and afterwards applied on the remaining 79 corrected spectra (51 females and 28 males), which were used as independent test set. The classification approach was based on spectral feature selection and iterative classification optimization. The selected spectral features were 550, 715, 912, 1215, 1304, 1958, 1966, 2214 cm^{-1} . The classification algorithm of nonlinear discriminant analysis supplied the probability of membership to female and male for each spectrum, which is shown in Fig 7. The reclassification of the training set was performed with a correct rate of 94% (females: 38/40, males: 37/40). The spectra of the test set were classified with a correct rate of 91% (females: 45/51, males: 27/28).

Hatching experiments were performed with 71 eggs that were randomly selected after optical spectroscopy measurement. The egg shell windows were closed with medical-grade gas-permeable adhesive tape, and the incubation continued under standard conditions of temperature and humidity. Further embryonic development and hatching behavior, as described elsewhere [27], were not affected. Healthy chicks hatched from 96% of eggs (68/71), without differences compared to intact eggs. All three embryos died at around day 19 (stage 45 [28], after the transfer from the incubator into the hatcher. The visual inspection of dead embryos did not provide any indication for a bacterial or fungal infection, or for malformations. A

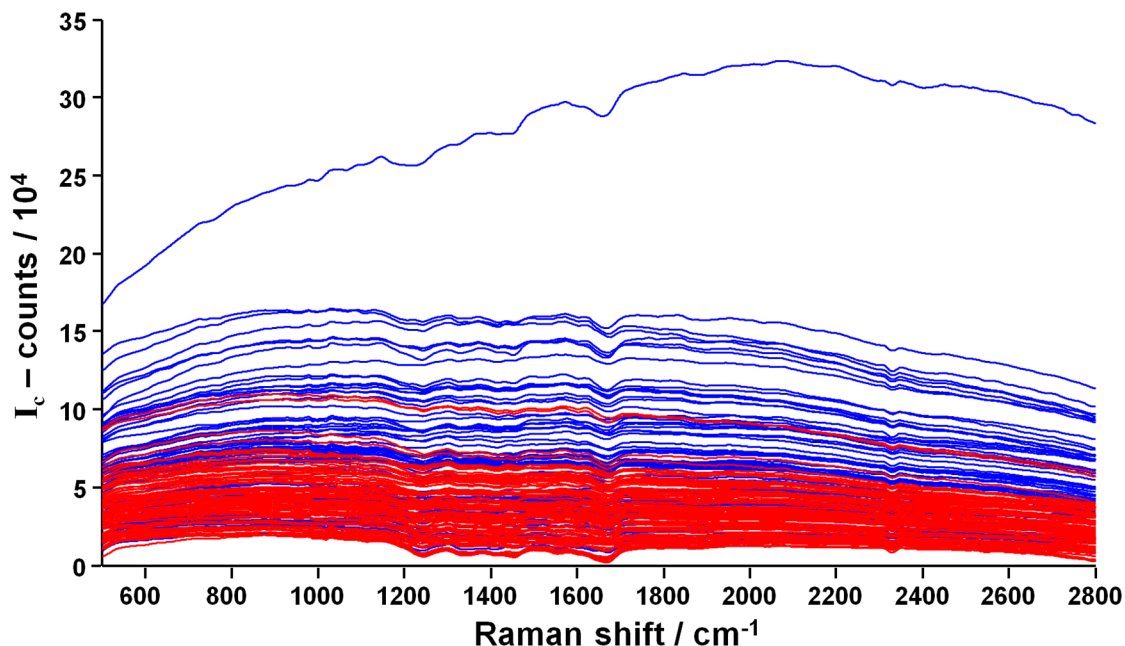


Fig 6. Correction to compensate for inner shell membrane effects. Spectra acquired on perfused blood vessels at the blunt pole of female (red) and male eggs (blue), after the correction described by Eq 5.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554.g006>

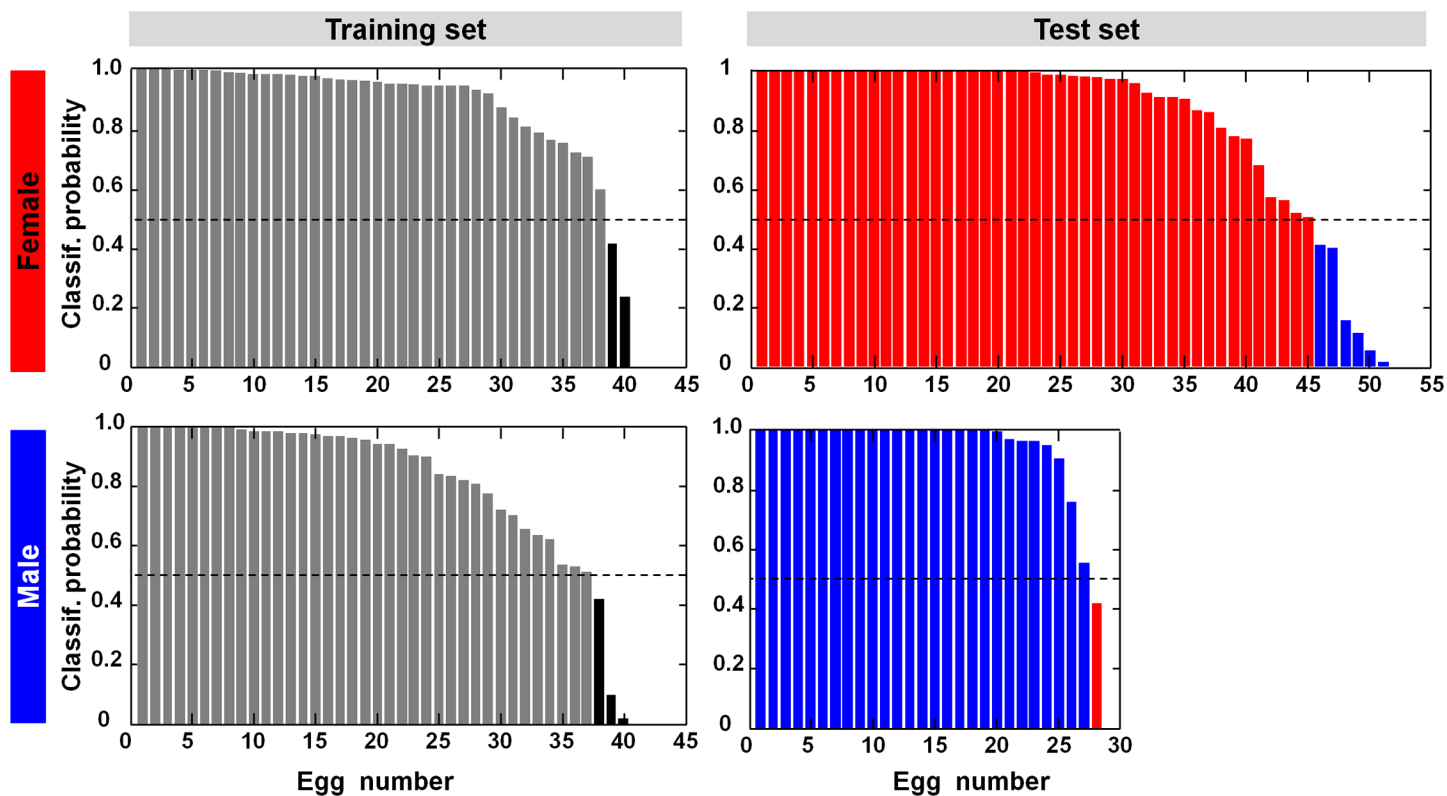


Fig 7. Supervised classification for egg sexing. The probability of class membership is reported for each spectrum of the training set and the independent test set of both classes.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192554.g007>

slightly retarded development was observed in two of the dead embryos, because the yolk sac was not fully absorbed. For the domestic chicken, it is well investigated that there are two time periods within the incubation where mortality of embryos is high, i.e., between the third and fifth days and on approximately the 19th day. Artificially incubated embryos are much more likely to die during the later period of susceptibility than embryos incubated under the hen. In the late critical period embryos might die because of failure to make a proper transition from the allantoic to pulmonary respiration, poor development of the hatching muscle, deficient oxygenation, water starvation, or a cumulative effect of all unfavorable conditions [29,30]. Hatched chicks did not display physical or behavioral anomalies. All chicks were clean with shiny dry down feathers without persisting feather sheets. Their eyes were clear and bright. Legs, feet and toes were straight without any deformities. The belly of each chick was soft and showed a clean dry navel without swelling. All chicks displayed exploratory behavior and started intake of food and water within a short time after hatching.

Discussion and conclusions

Sexing of circulating embryonic blood by optical spectroscopy is possible based on information carried by near infrared fluorescence and Raman signals. Fluorescence intensity of male blood is significantly higher compared to females. PCA also reveals a different spectral shape of fluorescence: the blood of males is characterized by a fluorescence band localized at about 910 nm. Sex-related differences are also present in the Raman spectrum, and PCA indicates differences in blood protein content. This is in agreement with the results of measurements performed at the pointed pole.

The presence of the inner shell membrane above the vessels affects the signal of blood in several ways. The membrane is a thin layer of proteinaceous fibers. First, it introduces Rayleigh scattering, inducing a decrease of signal intensity that depends on membrane thickness. Moreover, Raman bands of the membrane overlap with the spectrum of blood.

For these reasons, reliable sexing needs proper correction strategies of the spectra. The presented approach permitted to compensate for variable signal losses due to Rayleigh scattering caused by membranes of different thicknesses, as well as subtract their Raman contributions. After correction of the spectra, the feature selection algorithm identified spectral regions that mainly describe the fluorescence. Egg sexing based on supervised classification of the spectral features attained an overall correct rate of 93% (147/158). This result is fully comparable with in ovo spectroscopic sexing performed at the egg pointed pole without shell membrane [12,13].

The optical spectroscopic measurement on perfused blood vessels at the egg blunt pole enables to overcome several drawbacks of similar measurements performed at the pointed pole, where shell windowing implies also removal of eggshell membranes. The presence of the air cell at the blunt pole allows for shell fenestration while leaving the inner shell membrane intact. As this membrane provides main protection of the embryo against external bacteria, shell windowing at the blunt pole does not impact negatively on hatching rate. In contrast, egg fenestration at the pointed pole with a window of 15 mm in diameter led to a hatching rate reduction of 11% compared to control eggs without shell window (81% vs. 92%) [12].

The method here illustrated satisfies all requirements for in ovo sexing [31]. By leaving the inner membrane intact, the egg environment remains protected against external influences, which avoids any reduction of hatching rates. As also proven in former experiments, the optical measurement is “per se” damage-free, and does not have any negative effects beyond the ones related to shell windowing. Post-hatch animal behavior and development are not affected as well. From a technical point of view, the technique offers the possibility of full

automatization and does not require consumables, which is economically important for sexing of large amounts of eggs. Sexing is performed in seconds, so that male eggs are sorted out immediately after measurement. These could be used as protein source depending on national regulations, for example for fish feeding. Finally, the method improves animal welfare, as it is conducted before development of embryo sensitivity, and is therefore ethically more acceptable than culling of day-old chicks.

Compared to optical spectroscopic sexing performed at the pointed pole, the measurement at the blunt pole simplifies process automatization. As eggs are incubated with the blunt pole upward, shell windowing and measurement at the blunt pole provide several advantages. Handling is reduced, as turning of eggs before and after the measurement is no more required. Shell windowing is facilitated by presence of the air cell, which creates a gap between shell and egg structures. Damage-free laser windowing can thus be performed on the incubated eggs immediately before measurement. Moreover, the procedure of shell window sealing in female eggs after sexing is no more critical, as the risk of egg fluids' loss is avoided by upright positioning during incubation.

In conclusion, spectroscopic sexing at the blunt pole qualifies as a minimally invasive, precise method that facilitates egg handling and process automatization, thereby offering the best premises for deployment in the layer industry.

Supporting information

S1 Table. Fluorescence intensity of female eggs (n = 91) and of male eggs (n = 68), used to produce Fig 2B.

(PDF)

S2 Table. Scores of principal component analysis (female eggs n = 91, male eggs n = 68), used to produce Fig 4B and 4C.

(PDF)

Acknowledgments

The authors acknowledge publication fee support from the German Research Foundation and the Open Access Publication Funds of the SLUB/TU Dresden. We gratefully acknowledge Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven, Germany) for providing eggs. Special thanks to Prof. Rudolf Preisinger and Dr. Anke Förster (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, Germany) for the insightful discussions on hatchery practice.

Author Contributions

Conceptualization: Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns, Edmund Koch, Gerald Steiner.

Data curation: Roberta Galli, Grit Preusse, Christian Schnabel, Kerstin Cramer.

Formal analysis: Roberta Galli, Grit Preusse, Thomas Bartels, Gerald Steiner.

Funding acquisition: Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns, Edmund Koch, Gerald Steiner.

Investigation: Roberta Galli, Grit Preusse, Christian Schnabel.

Methodology: Roberta Galli, Grit Preusse, Gerald Steiner.

Project administration: Thomas Bartels, Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns, Edmund Koch, Gerald Steiner.

Resources: Christian Schnabel, Kerstin Cramer, Gerald Steiner.

Software: Roberta Galli, Christian Schnabel, Gerald Steiner.

Supervision: Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns, Edmund Koch, Gerald Steiner.

Validation: Roberta Galli, Grit Preusse, Gerald Steiner.

Visualization: Roberta Galli, Gerald Steiner.

Writing – original draft: Roberta Galli, Gerald Steiner.

Writing – review & editing: Roberta Galli, Grit Preusse, Christian Schnabel, Thomas Bartels, Kerstin Cramer, Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns, Edmund Koch, Gerald Steiner.

References

1. Rozenboim I, Ben Dor E. The use of reflectance spectroscopy for fertility detection in freshly laid egg and gender sorting in mid incubation period. *Poult Sci*. 2001; 90(E-Suppl. 1): 98.
2. Gohler D, Fischer B, Meissner S. In-ovo sexing of 14-day-old chicken embryos by pattern analysis in hyperspectral images (VIS/NIR spectra): A non-destructive method for layer lines with gender-specific down feather color. *Poult Sci*. 2017 Jan 1; 96(1): 1–4. <https://doi.org/10.3382/ps/pew282> PMID: 27591278
3. Yilmaz-Dikmen B, Dikmen S. A Morphometric Method of Sexing White Layer Eggs. *Braz J Poultry Sci*. 2013 Jul; 15(3): 203–10.
4. Webster B, Hayes W, Pike TW. Avian egg odour encodes information on embryo sex, fertility and development. *Plos One*. 2015; 10(1): e0116345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116345> PMID: 25629413
5. Clinton M, Nandi S, Zhao D, Olson S, Peterson P, Burdon T, et al. Real-Time Sexing of Chicken Embryos and Compatibility with in ovo Protocols. *Sex Dev*. 2016; 10(4): 210–6. <https://doi.org/10.1159/000448502> PMID: 27559746
6. Phelps P, Bhutada A, Bryan S, Chalker A, Ferrell B, Neuman S, et al. Automated identification of male layer chicks prior to hatch. *Worlds Poult Sci J*. 2003 Mar; 59(1): 33–8.
7. Tran HT, Ferrell W, Butt TR. An estrogen sensor for poultry sex sorting. *J Anim Sci*. 2010 Apr; 88(4): 1358–64. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2212> PMID: 20081077
8. Weissmann A, Reitemeier S, Hahn A, Gottschalk J, Einspanier A. Sexing domestic chicken before hatch: A new method for in ovo gender identification. *Theriogenology*. 2013 Aug; 80(3): 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.014> PMID: 23726296
9. Steiner G, Bartels T, Stelling A, Krautwald-Junghanns ME, Fuhrmann H, Sablinskas V, et al. Gender determination of fertilized unincubated chicken eggs by infrared spectroscopic imaging. *Anal Bioanal Chem*. 2011 Jul; 400(9): 2775–82. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4941-3> PMID: 21479544
10. Fineman RM, Schoenwolf GC, Huff M, Davis PL. Causes of windowing-induced dysmorphogenesis (neural tube defects and early amnion deficit spectrum) in chicken embryos. *Am J Med Genet*. 1986 Nov; 25(3): 489–505. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320250311> PMID: 3098099
11. Speksnijder G, Ivarie R. A modified method of shell windowing for producing somatic or germline chimeras in fertilized chicken eggs. *Poult Sci*. 2000 Oct; 79(10): 1430–3. PMID: 11055849
12. Galli R, Preusse G, Uckermann O, Bartels T, Krautwald-Junghanns ME, Koch E, et al. In Ovo Sexing of Domestic Chicken Eggs by Raman Spectroscopy. *Anal Chem*. 2016 Aug 22; 88: 8657–63. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01868> PMID: 27512829
13. Galli R, Preusse G, Uckermann O, Bartels T, Krautwald-Junghanns ME, Koch E, et al. In ovo sexing of chicken eggs by fluorescence spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2017 Feb; 409(5): 1185–94. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0116-6> PMID: 27966169
14. Brown WE, Baker RC, Naylor HB. The Role of the Inner Shell Membrane in Bacterial Penetration of Chicken Eggs. *Poult Sci*. 1965 Sep 1; 44(5): 1323–7.
15. Makkar S, Liyanage R, Kannan L, Packialakshmi B, Lay JO Jr., Rath NC. Chicken Egg Shell Membrane Associated Proteins and Peptides. *J Agric Food Chem*. 2015 Nov 11; 63(44): 9888–98. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04266> PMID: 26485361
16. Lifshitz A, Baker RC, Naylor HB. The Relative Importance of Chicken Egg Exterior Structures in Resisting Bacterial Penetration. *J Food Sci*. 1964 Jan 1; 29(1): 94–9.
17. Rosenbruch M. Early stages of the incubated chicken egg as a model in experimental biology and medicine. *ALTEX*. 1994; 11(4): 199–206. PMID: 11178387

18. Rosenbruch M. The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. *ALTEX*. 1997; 14(3): 111–3. PMID: [11178496](#)
19. Meissner S, Knels L, Koch E. Improved three-dimensional Fourier domain optical coherence tomography by index matching in alveolar structures. *J Biomed Opt*. 2009 Nov; 14(6): 064037. <https://doi.org/10.1117/1.3275472> PMID: [20059275](#)
20. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jun 28; 9(7): 676–82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019> PMID: [22743772](#)
21. Nys Y, Gautron J. Structure and Formation of the Eggshell. In: Huopalahti R, Lopez-Fandino R, Anton M, Schade R, editors. *Bioactive Egg Compounds*. Berlin Heidelberg: Springer; 2007. p. 99–102.
22. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc Rev*. 2007; 42(5): 493–541.
23. Rygula A, Majzner K, Marzec KM, Kaczor A, Pilarczyk M, Baranska M. Raman spectroscopy of proteins: a review. *J Raman Spectrosc*. 2013 Aug 1; 44(8): 1061–76.
24. Nakano T, Ikawa NI, Ozimek L. Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. *Poult Sci*. 2003 Mar; 82(3): 510–4. PMID: [12705414](#)
25. Kubelka P, Munk F. Ein Beitrag Zur Optik Der Farbanstriche. *Zeitschrift für Technische Physik*. 1931; 12: 593–601.
26. Kortüm G, Oelkrug D. Über den Streukoeffizienten der Kubelka-Munk Theorie. *Z Naturforsch A*. 1964; 19(1): 28–37.
27. Tong Q, Romanini CE, Exadaktylos V, Bahr C, Berckmans D, Bergoug H, et al. Embryonic development and the physiological factors that coordinate hatching in domestic chickens. *Poult Sci*. 2013 Mar; 92(3): 620–8. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02509> PMID: [23436512](#)
28. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph*. 1951; 88: 49–92. PMID: [24539719](#)
29. Romanoff AL. Critical periods and causes of death in avian embryonic development. *Auk* 1949 Jul; 66(3): 264–270.
30. Máchal L, Zatloukal M, Jeřábek S, Molnárová Z. The process of embryonic mortality in seven initial laying strains during incubation. *Arch Anim Breed*. 2003; 46: 483–489.
31. Kaleta EF, Redmann T. Approaches to determine the sex prior to and after incubation of chicken eggs and of day-old chicks. *Worlds Poult Sci J*. 2008 Sep; 64(3): 391–9.