

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
03. Januar 2019 (03.01.2019)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2019/001604 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

A01K 67/02 (2006.01) A01K 61/17 (2017.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2018/000202

(22) Internationales Anmeldedatum:

29. Juni 2018 (29.06.2018)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2017 114 654.7

30. Juni 2017 (30.06.2017) DE

(71) Anmelder: EVONTA-TECHNOLOGY GMBH
[DE/—]; Maria-Reiche-Straße 1, 01109 Dresden (DE).

(72) Erfinder: FISCHER, Björn; Hoher Weg 8, 09212 Lim-
bach-Oberfrohna (DE). MEISSNER, Sven; Am Wasser-
lauf 6, 09618 Brand-Erbisdorf (DE).

(74) Anwalt: KRAUSE, Wolfgang; Am Schweizerwald 1,
09648 Mittweida (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP,
KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,

SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,
LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,
SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR EXAMINING FISH EGGS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR UNTERSUCHUNG VON FISCHEIERN

(57) Abstract: The invention is based on the field of process technology and relates to a method for examining fish eggs, in particular the development of fish eggs in fish farms. The aim of invention is to provide a method and a device in which the development is reliably determined independently of an operator/user. The aim of the invention is achieved according to a method in which a sample of fish eggs is taken, is placed in a sample holder and is examined using optical coherence tomography. Then, the measuring head of an optical coherence tomography system is positioned over each fish egg, and in the measurement area, the data from the fish blastodisc and/or embryonic structure of the fish eggs is taken and the determined data is evaluated and from the sample, at least the developmental state of each examined fish egg is determined. The measuring area of each fish egg is positioned at a distance to the measuring head in which the fish blastodisc and/or the embryonic structure of the fish egg is located at least in sections.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Verfahrenstechnik und betrifft ein Verfahren zur Untersuchung von Fischeiern, beispielsweise des Entwicklungszustandes der Fischeier in Fischfarmen. Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Angabe eines Verfahrens und einer Vorrichtung bei dem die Ermittlung des Entwicklungszustandes unabhängig von einem Operator/Bediener gesichert erfolgt. Gelöst wird die Aufgabe durch ein Verfahren, bei dem eine Probe mit Fischeiern entnommen und in einen Probenhalter gegeben und mittels optischer Kohärenztomografie untersucht wird, und dabei der Messkopf eines optischen Kohärenztomografiesystems über jedes Fischei positioniert wird, und in dem Messbereich die Daten der Fischeikeimscheibe und/oder embryonalen Struktur des Fischeis aufgenommen und die ermittelten Daten ausgewertet und mindestens der Entwicklungszustand jedes untersuchten Fischeies der Probe festgestellt wird, wobei der Messbereich jedes Fischeis in einen Abstand zum Messkopf positioniert wird, in dem sich mindestens bereichsweise die Fischeikeimscheibe und/oder die embryonale Struktur des Fischeis befindet.



WO 2019/001604 A1

Verfahren und Vorrichtung zur Untersuchung von Fischeiern

Die Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtungen zur Untersuchung von Fischeiern.

5

In der Regel werden weibliche Fische geschlechtsreif, wenn sie drei bis vier Jahre alt sind. Mit der Geschlechtsreife sind sie fähig, Eier, sogenannte Rogen, abzulegen. Aus diesem Grund bezeichnet man einen geschlechtsreifen weiblichen Fisch auch als Rogner. Etwa zum selben Zeitpunkt werden auch die

10 Männchen geschlechtsreif und bilden die sogenannte Milch, die sie über den Eiern ablegen. Für geschlechtsreife Männchen verwendet man deshalb auch den Begriff Milchner.

15

Zur Versorgung des Bedarfs werden Fische auch in Fischfarmen gezüchtet. Je nach Fischart werden die Fische in Aquakulturen in Teichen, Flüssen, Seen, Brackwasser oder Meerwasser unter kontrollierten Bedingungen gehalten und aufgezogen.

20

Weiter ist das Verfahren der optischen Kohärenztomografie (OCT optical coherence tomography) als ein Untersuchungsverfahren bekannt, bei dem Licht geringer Kohärenzlänge mit Hilfe eines Interferometers zur bildgebenden, tomographischen Untersuchung streuender Materialien eingesetzt wird.

25

Vorteilhafterweise ist dabei die Tiefenauflösung von der transversalen Auflösung entkoppelt. Die rein auf optischer Streuung basierende und damit berührungslose Messung, erlaubt die bildgebende räumliche Untersuchung biologischen Gewebes und dessen innerer Strukturen. Das Haupteinsatzgebiet ist die Medizin.

30

Die Druckschrift GLADYS, Fanny Moses, et. al. Developmental and morphological studies in Japanese medaka with ultra-high resolution optical coherence tomography. Biomedical optics express, 2015, 6. Jg., Nr. 2, S. 297 bis 308. beinhaltet ein Verfahren zur Untersuchung von Fischeiern mittels optischer Kohärenztomografie. Das betrifft insbesondere die embryonale

Struktur von Fischeiern von Zebrafischen in deren embryonalen Entwicklung. Eine Aussage über den Befruchtungszustand der Fischeier ist nicht vorgesehen.

- 5 Die Druckschrift US 2008 / 0289 578 A1 offenbart Verfahren zur nichtinvasiven Lokalisierung von Blastodermen innerhalb von Vogeleiern.

Durch die Druckschrift US 3 746 166 A ist eine Fischeisortiervorrichtung zum Trennen kleiner Eier von größeren Eiern bekannt. Eine rotierende Scheibe
10 besitzt eine Reihe sich verjüngender Löcher. Kleinere Eier verkeilen sich in diesen Löchern, während größere Eier herausgeblasen werden können. Eine Untersuchung der Eier ist nicht vorgesehen.

Die Druckschrift US 4 214 551 A beinhaltet einen Träger für Fischeier, die
15 mittels einer waffelgemusterten Oberfläche einzeln angeordnet sind und sich damit separat voneinander entwickeln können. Träger können dazu auch stapelbar ausgebildet sein. Die Fischeier werden nicht untersucht.

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Angabe eines Verfahrens zur
20 Untersuchung von Fischeiern, bei dem die Ermittlung des Entwicklungszustandes, insbesondere des Befruchtungszustandes unabhängig von einem Operator/Bediener gesichert erfolgt und dies mit einer einfachen Vorrichtung realisiert wird.

25 Die Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen angegebene Erfindung gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind Gegenstand der Unteransprüche, wobei die Erfindung auch Kombinationen der einzelnen abhängigen Ansprüche im Sinne einer und-Verknüpfung mit einschließt, solange sie sich nicht gegenseitig ausschließen.

30

Gelöst wird die Aufgabe durch ein Verfahren zur Untersuchung von Fischeiern, bei dem eine Probe mit Fischeiern entnommen und in einen Probenhalter gegeben wird, wobei die Fischeier durch den Probenhalter separiert und

vereinzelt werden, und die einzelnen Fischeier in dem Probenhalter mittels optischer Kohärenztomografie untersucht werden, und dabei der Messkopf eines optischen Kohärenztomografiesystems über jedes Fischei positioniert wird, und in dem Messbereich die Daten der Fischeikeimscheibe und/oder embryonalen Struktur des Fischeis aufgenommen und nachfolgend die 5 ermittelten Daten ausgewertet und mindestens der Entwicklungszustand und/oder Befruchtungszustand jedes untersuchten Fischeies der Probe festgestellt wird, wobei der Messbereich jedes Fischeis in einen Abstand zum Messkopf positioniert wird, in dem sich mindestens bereichsweise die 10 Fischeikeimscheibe und/oder die embryonale Struktur des Fischeis befindet.

Vorteilhafterweise werden die Fischeier der Probe in einzelne Öffnungen des Probenhalters eingebracht, die jeweils nur ein Fischei aufnehmen und weiterhin durch ihre Größe die Rotation des Fischeis in der Öffnung ermöglichen.

15

Ebenfalls vorteilhafterweise wird Flüssigkeit in den Probenhalter gegeben, wobei für alle untersuchten Fischeier ein gleicher Flüssigkeitsüberstand über jedem Fischei realisiert wird.

20 Und auch vorteilhafterweise wird mittels mindestens einer Kamera der jeweils konkrete Abstand zwischen Fischeikeimscheibe und/oder embryonaler Struktur und Messkopf des optischen Kohärenztomografiesystems und/oder der Messbereich für den Messkopf des optischen Kohärenztomografiesystems ermittelt.

25

Noch vorteilhafterweise wird mittels des Messkopfes des optischen Kohärenztomografiesystems und einer Kamera und/oder eines Abstandssensors über jedem Fischei der konkrete Abstand zum Fischei gemessen und der Zustand der Fischeikeimscheibe und/oder der embryonalen 30 Struktur des Fischeies insgesamt, anhand der spektralen Daten und/oder eines rekonstruierten Bilddatensatzes, eines Bildes analysiert und/oder dokumentiert.

Weiter vorteilhafterweise wird als Probe eine proportionale Menge aus der Gesamtmenge entnommen und aus den ermittelten Daten über den Befruchtungszustand jedes untersuchten Fischeies der Probe proportional der Entwicklungszustand und/oder Befruchtungszustand der Gesamtmenge
5 festgestellt.

Vorteilhafterweise wird als Flüssigkeit eine Flüssigkeit eingesetzt, in der die Fischeier überleben. Das kann insbesondere Fluss-, See-, Meereswasser oder isotonische Kochsalzlösung sein.

10

Ebenfalls wird die Aufgabe gelöst durch eine Vorrichtung zur Untersuchung von Fischeiern, mindestens bestehend aus einem Probenhalter, der einen Träger für eine Flüssigkeit aufweist, und weiterhin eine Platte mit einer Vielzahl an Öffnungen, die einerseits vom Träger entfernbar und vom Boden des Trägers
15 beabstandet angeordnet ist und wobei die Platte im Falle des Vorhandensein von Flüssigkeit im Träger immer vollständig innerhalb der Flüssigkeit angeordnet ist, und die Öffnungen in der Platte in Form und Größe an die zu untersuchenden Fischeier angepasst sind, wobei durch die Öffnungen in der Platte die Fischeier einerseits örtlich an der Position der Öffnung gehalten und
20 andererseits eine drehende Bewegung der Fischeier in der Öffnung realisiert ist, um eine Ausrichtung der Keimscheibe oder embryonalen Struktur zu ermöglichen. Weiterhin sind die Öffnungen in der Platte vom Rand des Trägers außerhalb des Randwinkels der Flüssigkeit angeordnet, und die in den Öffnungen befindlichen Fischeier für ein optisches Kohärenztomografiesystem
25 frei zugänglich sind.

Vorteilhafterweise kann der Träger rechteckig oder quadratisch ausgeführt sein, wobei Länge und Breite um Größenordnungen größer als die Höhe des Trägers sind.

30

Ebenfalls vorteilhafterweise ist die Höhe des Trägers mindestens größer als der maximale Durchmesser der zu untersuchenden Fischeier zuzüglich der überstehenden Flüssigkeit.

Weiter vorteilhafterweise weisen die Öffnungen einen im Wesentlichen runden Durchmesser auf, der größer ist als der maximale Durchmesser der jeweils zu untersuchenden Fischeier.

- 5 Vorteilhafterweise ist die Platte mit Abstandshaltern innerhalb des Trägers positioniert.

Und auch vorteilhafterweise ist die Platte aus dem Träger mit oder ohne Flüssigkeit und mit oder ohne Fischeier entfernbar.

10

Vorteilhafterweise sind die Öffnungen in der Platte jeweils von Rand des Trägers beabstandet außerhalb des Randwinkels der Flüssigkeit angeordnet.

Besonders vorteilhafterweise ist der Probenhalter in ein optisches

- 15 Kohärenztomografiesystem positioniert und dort entweder fest positioniert oder in X- und/oder Y-Richtung beweglich unter einem Messkopf des optischen Kohärenztomografiesystems angeordnet.

Vorteilhafterweise ist der Probenhalter in ein optisches

- 20 Kohärenztomografiesystem positioniert und dort entweder fest positioniert oder in X- und/oder Y-Richtung unter einem Messkopf des optischen Kohärenztomografiesystems und mindestens einer Kamera und/oder mindestens einem Abstandssensor beweglich angeordnet.

- 25 Die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist zur Beurteilung des Entwicklungszustandes und/oder des Befruchtungszustandes von Fischeiern.

Damit ist es möglich, die Ermittlung des Entwicklungszustandes, insbesondere des Befruchtungszustandes, unabhängig von einem Operator/Bediener

- 30 gesichert durchzuführen und dies mit einer einfachen Vorrichtung.

Vorteilhafterweise erfolgt die Ermittlung des Entwicklungszustandes automatisch. Das wird durch ein Verfahren zur Untersuchung von Fischeiern

erreicht, bei dem Fischeier (kontinuierlich oder diskontinuierlich) entnommen und in einen Probenhalter vereinzelt werden. Der Probenhalter besteht dazu mindestens aus einem Träger für eine Flüssigkeit und weiterhin einer Platte mit einer Vielzahl an Öffnungen.

5

Die Erfindung wird auch gelöst, indem eine oder mehrere Proben der Fischeier zur Untersuchung entnommen werden und zur Durchführung des Verfahrens zur Untersuchung von Fischeiern einer Probeaufnahmevorrichtung, die ein Probenhalter, eine karussellförmige (vereinzelte radförmige)

10 Aufnahmevorrichtung oder ein schlauchartiger Probenaufnehmer ist, zugeführt werden. Diese Proben können diskontinuierlich oder kontinuierlich entnommen und anschließend nach der Messung wieder zurückgeführt werden.

Vorteilhafterweise werden die Fischeier durch eine optisch transparente
15 röhrenförmige Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens zur Untersuchung von Fischeiern transportiert. Die Fischeier können ebenfalls vorteilhafterweise in einem Inkubator sein, werden von diesem Inkubator durch die genannte röhrenförmige Vorrichtung zur Untersuchung transportiert und noch vorteilhafterweise im Anschluss an die Untersuchung wieder dem Inkubator
20 zugeführt.

Die Fischeier können vorteilhafterweise durch den Probenhalter separiert und vereinzelt werden. Die Probe aus Fischeiern in einer Flüssigkeit kann durch ein Sieb gegeben werden, so dass die Flüssigkeit abgeleitet wird. Anschließend
25 kann die Probe über den Träger mit der Platte gegeben werden, so dass durch geringfügige mechanische Bewegungen des Probenhalters insgesamt die Fischeier in die Öffnungen gelangen. Die aktive Manipulation im Sinne des Verbringens des individuellen Fischeis in eine Öffnung des Halters, kann auch mit Hilfe eines Werkzeuges, zum Beispiel eines sogenannten Rakels oder eines
30 Pinsels erfolgen. Der Überstand an Fischeiern, die nicht in Öffnungen positioniert sind, kann entfernt werden. Da vorteilhafterweise in jede einzelne Öffnungen des Probenhalters jeweils nur ein Fischei aufgenommen wird, kann durch die Bekanntheit der Anzahl an Öffnungen in der Platte gleich die Anzahl

an zu untersuchenden Fischeiern festgelegt und eindeutig bestimmt werden. Der Transfer der Probe auf den Probenträger erfolgt vorteilhafterweise beschädigungsfrei, so dass die Fischeier noch völlig intakt sind.

- 5 Sofern nicht mehr ausreichend Flüssigkeit im Träger vorhanden ist, so dass die Fischeier nicht vollständig mit der Flüssigkeit bedeckt sind, oder die Flüssigkeit vorher abgeführt wurde, wird diese ergänzt, so dass alle Fischeier in den Öffnungen von einer gleichhohen Flüssigkeitssäule im Träger bedeckt sind und damit ein gleicher Flüssigkeitsüberstand über jedem Fischei realisiert wird. Als
- 10 Flüssigkeit wird vorteilhafterweise eine Flüssigkeit eingesetzt, in der die Fischeier überleben, wie beispielsweise Fluss- oder See- oder Meereswasser. Es sind aber auch andere Flüssigkeiten einsetzbar, sofern sie keine negativen Auswirkungen die Fischeier haben. Sofern eine Kontamination der Fischeier durch die angewandte Flüssigkeit oder durch die Entnahme und Manipulation
- 15 der Fischeier ausgeschlossen werden kann, können die untersuchten Fischeier der Probe wieder der Gesamtmenge an Fischereiern, aus der die Probe entnommen worden ist, zugeführt werden. Prinzipiell kann eine Untersuchung der Eier auch ohne Wasserüberstand oder im trockenen Gefäß erfolgen.
- 20 Die Fischeier können in den Öffnungen positioniert werden, da die Platten mit den Öffnungen vom Boden des Trägers beabstandet angeordnet ist und die Platte im Falle des Vorhandensein von Flüssigkeit im Träger immer vollständig innerhalb der Flüssigkeit angeordnet ist. Dadurch werden einerseits die Fischeier örtlich an der Position der Öffnung gehalten. Andererseits muss aber
- 25 der maximale Durchmesser der Öffnungen immer mindestens so groß sein, dass mindestens eine drehende Bewegung der Fischeier in der Öffnung realisiert wird. Dies ist erforderlich, da sich die Fischeier nach Positionierung in den Öffnungen eigenständig drehen und ausrichten. Dabei ordnet sich die Keimscheibe oder die embryonale Struktur im Bereich der oberen Halbschale
- 30 des Eies an. Dies ist eine natürliche Bewegung, die mit dem inneren Aufbau und den Dichteverhältnissen im Ei zusammenhängt. Durch das selbständige Ausrichten der Fischeier mit Anordnung der Keimscheibe oder der embryonalen

Struktur im oberen Bereich, ist eine einwandfreie Zugänglichkeit für das in Reflexion arbeitende Optische Kohärenztomografiesystem gewährleistet.

5 Da die Platte mit den Öffnungen aus dem Träger entfernbar ist, kann je nach Typ der zu untersuchenden Fischeiern eine Platte mit entsprechend großen Öffnungen in den Träger eingesetzt werden. Je nach Saison, Fischart und Befruchtungszustand differieren die maximalen mittleren Durchmesser der Fischeier.

10 Zu beachten ist, dass die Öffnungen in der Platte vom Rand des Trägers außerhalb des Randwinkels der Flüssigkeit angeordnet sind, so dass keine Verfälschung der ermittelten Messwerte durch einen unterschiedlichen Flüssigkeitsüberstand über den Fischeiern auftreten kann.

15 Weiterhin sind durch die erfindungsgemäße Lösung die in den Öffnungen befindlichen Fischeier für das optische Kohärenztomografiesystem frei zugänglich.

20 Ein optisches Kohärenztomografiesystem enthält mindestens einen Messkopf, ein Spektrometer und eine Lichtquelle. Mittels des optischen Kohärenztomografiesystems wird auf optischer Streuung basierend und damit berührungslos eine Messung der Fischeikeimscheibe und/oder der embryonalen Struktur des jeweiligen Fischeis durchgeführt. Die erhaltenen spektralen Daten und/oder die Daten eines rekonstruierten Bilddatensatzes
25 erlauben die bildgebende räumliche Untersuchung des biologischen Gewebes und der inneren Struktur der Fischeier. Die Daten und Bilder können analysiert und/oder dokumentiert werden. Dabei ist von Bedeutung, dass der jeweilige Messbereich, von dem die Querschnittsbilder aufgenommen werden, sich mindestens im Bereich des oder der Untersuchungsobjekte befindet (ROI –
30 Region of Interest), so dass unter Umständen nach jeder oder mehreren Messungen eine Anpassung des Abstandes zwischen dem Messkopf und dem Untersuchungsobjekt vorgenommen werden muss. Sofern der notwendige Abstand zwischen Untersuchungsobjekt und Messkopf nicht bereits vor

Messung bekannt oder nahezu bekannt ist, kann über eine Abstandsmesser der Abstand ermittelt oder in unterschiedlichen Abständen jeweils eine Messung durchgeführt werden.

- 5 Die Fischeier werden für die Messung mindestens unter dem Messkopf, im Messbereich des optischen Kohärenztomografiesystems positioniert. Eine zusätzliche Kamera kann die Auswahl der ROI, in der der Messbereich liegen soll, im von oben betrachteten Fischei erleichtern.
- 10 Mit Hilfe des optischen Kohärenztomografiesystems werden dreidimensionale Bilddaten aus dem Eiinneren gewonnen, verarbeitet und klassifiziert. So lassen sich beim befruchteten Ei bereits nach wenigen Stunden Einzelzellen differenzieren. Prinzipiell ist mittels OCT eine online-Beobachtung der Zellteilungsprozesse möglich.
- 15 Nach lateraler Ausrichtung des OCT-Messfeldes, zum Beispiel mit Hilfe einer Kamera, wird der axiale Messbereich des OCT-Systems zum Beispiel durch Bewegung des OCT-Messkopfes relativ zum Fischei verschoben und so positioniert, dass sich die embryonale Struktur des Fischeis möglichst optimal
- 20 im Messbereich darstellt. Ist dies gewährleistet, wird ein Volumendatensatz (Tomogramm) der embryonalen Struktur im Fischei aufgenommen und mittels Bildverarbeitungssoftware ausgewertet. Dabei können folgende wesentliche Ergebnisse vorkommen:
- Unbefruchtet
 - 25 - Befruchtet
 - Kugelstruktur (Blob)
 - Nicht messbar.

Dabei sind lediglich in befruchteten Fischeier, Fischembryonen im Vielzell- bis

30 Maulbeerstadium (Morula)nachweisbar. Unbefruchtete Fischeier zeigen normale Opazität aber keine nachweisbare Zellstruktur. Eine selten auftretende Anomalie stellt der sogenannte „Blob“ dar. Hier findet sich anstelle der stark strukturierten Morula eine glatte, kugelförmige Struktur vergleichbarer Größe.

Da sich hieraus kein Fischembryo entwickelt, werden die betreffenden Eier der Menge der unbefruchteten zugeordnet. Bei beschädigten Eiern, die aufgrund verschiedener äußerer Einflüsse abgestorben oder denaturiert sind geht die natürliche Opazität in den meisten Fällen verloren, so dass eine Untersuchung
5 mittels OCT nicht mehr möglich ist oder keine verwertbaren Ergebnisse liefert.

Nach Ermittlung des Befruchtungszustandes jedes Fischeies in den Öffnungen in der Platte, die als Probe dienen und die eine proportionale Menge aus der Gesamtmenge sind, wird aus den ermittelten Daten über den
10 Befruchtungszustand jedes untersuchten Fischeis der Probe proportional der Befruchtungszustand der Gesamtmenge an Fischeiern, von der die Probe entnommen worden ist, festgestellt.

Weiterhin ist es mit dem Verfahren möglich, neben dem Befruchtungszustand
15 den jeweiligen Entwicklungszustand der befruchteten Fischeier festzustellen. Mit dieser Erkenntnis lässt sich über die Wassertemperatur im Inkubator die Schlupfzeit der Fische regulieren.

Vorteilhafterweise ist der Träger rechteckig oder quadratisch ausgeführt und
20 seine Länge und Breite sind um Größenordnungen größer als die Höhe des Trägers. Vorteilhafterweise ist solch ein Träger eine flache Schale, in der die Flüssigkeit gehalten wird. Dabei ist die Höhe des Trägers mindestens größer als der maximale mittlere Durchmesser der zu untersuchenden Fischeier zuzüglich der überstehenden Flüssigkeit.

25 Die Öffnungen in der Platte weisen einen im Wesentlichen runden Durchmesser auf, da die Fischeier auch im Wesentlichen kugelförmig sind. Der Durchmesser der Öffnungen sollte dabei größer als der maximale mittlere Durchmesser der jeweils zu untersuchenden Fischeier sein, damit die Fischeier in der Öffnung
30 positioniert werden. Der Durchmesser der Öffnungen sollte aber auch nicht so groß sein, dass die Fischeier nicht im Wesentlichen ortsfest positionierbar sind, beispielsweise in der Öffnung schwimmen und dann nicht sicher von der Messung erfasst werden können.

Ebenfalls ist die Platte vom Boden des Trägers beabstandet angeordnet. Dies kann beispielsweise durch Abstandshalter innerhalb des Trägers realisiert werden. Der Abstand zwischen Boden des Trägers und Platte sollte aber kleiner als der maximale durchschnittliche Durchmesser der zu untersuchenden Fischeier sein, damit diese nicht unterhalb der Platte den Bereich der Öffnungen verlassen und dann nicht mehr für die Messung zugänglich sind.

Nach Positionierung der Fischeier in dem Probenhalter wird dieser in ein optisches Kohärenztomografiesystem positioniert und dort entweder selbst fest positioniert und der Messkopf des optischen Kohärenztomografiesystems und optional mindestens eine Kamera sind in X- und/oder Y-Richtung beweglich angeordnet, oder der Probenhalter mit den Fischeiern wird unter einem Messkopf eines optischen Kohärenztomografiesystems und der Kamera und optional mindestens einem Abstandssensor in X- und/oder Y-Richtung beweglich angeordnet.

Damit kann eine automatische Untersuchung des Befruchtungszustandes von Fischeiern in großer Menge, fortlaufend unter gleichbleibenden Bedingungen und unabhängig von menschlichen Einflüssen durchgeführt werden.

Weiterhin kann eine Kamera eingesetzt werden, um schneller zu einem Messergebnis zu gelangen. Dabei wird mit Hilfe der Kamera der Bereich bestimmt, der mit dem Messkopf des optischen Kohärenztomografiesystems untersucht werden soll. Aufgrund dieser Bereichsbestimmung ist es möglich den Messbereich für die tomografische Messung zu verkleinern und somit die Messzeit zu verringern.

Nachfolgend wird die Erfindung an mehreren Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Ein quadratischer, schalenförmig ausgeführter Träger aus optisch transparenten Kunststoff mit den Abmessungen 100 mm Breite x 100 mm Länge und 15 mm Höhe und einer Materialdicke von 2 mm enthält eine Einlegeplatte mit den
5 Abmessungen 996 mm Breite x 96 mm Länge und einer Dicke von 2 mm. Im Inneren des schalenförmig ausgeführten Trägers befindet sich eine umlaufende, an den inneren Ecken unterbrochene Stufenfräsung mit einer Stufenhöhe von 4 mm, so dass die Einlegeplatte planparallel, mit einem Abstand von 4 mm zum
10 Boden des schalenförmigen Gefäßes positioniert werden kann.

Die Platte weist eine Anzahl von 100 Öffnungen mit einem Durchmesser von 8 mm auf, wobei die dem Rand der Platte jeweils nächsten Öffnungen jeweils zum Rand der Platte in einem Abstand von 0,5 cm angeordnet sind.

15

100 befruchtete Lachseier werden zum Beispiel mittels eines Absaugschlauches aus dem Inkubator zufällig entnommen, mittels eines geeigneten Siebs aufgefangen und in das schalenförmige Probengefäß, auf welches ein Hilfsrahmen aufgesteckt ist, eingefüllt und auf die eingelegte Platte
20 verbracht. Die Eier werden anschließend mit Hilfe eines Pinsels in die Löcher/ Öffnungen der Einlegeplatte geschoben. Abschließend wird der zur Befüllung genutzte Hilfsrahmen entfernt und eine geeignete Menge Wasser in das Gefäß gebracht, so dass sich ein gleichmäßiger Flüssigkeitsüberstand oberhalb der Eier einstellt. Anschließend wird das so vorbereitete Probengefäß als
25 Probenhalter für 5-20 min ruhig gelagert um ein selbständiges Ausrichten der Eier zu ermöglichen. Danach haben sich alle intakten Fischeier so ausgerichtet, dass sich deren embryonalen Strukturen oder die Keimscheiben im Bereich der nach oben gerichteten Kugelhälfte befinden.

30 Danach wird der Probenhalter in einer Vorrichtung zur automatischen Messung des Befruchtungszustandes von Fischeiern mittels optischer Kohärenztomografie positioniert. Der an einer geeigneten Positioniereinheit befestigte OCT-Messkopf mit integrierter Kamera fährt automatisch den ersten

Messplatz an und detektiert mit Hilfe eines Kamerabildes die ROI (Region of Interest) im Lachsei. Das so ermittelte Koordinatenpaar definiert den Mittelpunkt der anschließenden OCT-Messung zur Anpassung des Abstandes zwischen Messkopf und ROI (Messbereich). Nachfolgend beginnt die tomografische Erfassung der Zielstruktur mit einem Betrachtungsfeld von 2 mm. Der
5 aufgenommenen Tomografiedatensatz wird online ausgewertet, so dass das Ergebnis unmittelbar nach der Messung zur Verfügung steht. Die benötigte Zeit für die Untersuchung und Auswertung von 100 Lachseiern mit Bestimmung der prozentualen Befruchtungsrate beträgt 6 min. Um eine statistisch relevante
10 Aussage zum Befruchtungszustand im Herkunftsinubator treffen zu können werden angepasst an die Anzahl der Eier im Inkubator mehrere Durchläufe mit je 100 Lachseiern benötigt

Werden beispielsweise 4 Probenhalter mit je 100 Lachseiern untersucht und
15 eine durchschnittliche Befruchtungsrate von 96 % ermittelt, kann extrapoliert werden, dass auch 96 % der im Behälter befindlichen 10-fachen Menge an Lachseiern befruchtet sind.

Das Untersuchungsergebnis an den Lachseiern ist damit unabhängig von
20 einem Operator/Bediener und damit reproduzierbar gesichert.

Beispiel 2

25 500 befruchtete Lachseier werden mittels eines Absaugschlauches aus dem Inkubator zufällig entnommen und durch einen transparenten Schlauch geführt. In dem Schlauch befindet sich eine Messzelle zur automatischen Messung des Befruchtungszustandes von Fischeiern mittels optischer Kohärenztomografie. Der an einer geeigneten Positioniereinheit befestigte OCT-Messkopf ist mit
30 einer integrierten Kamera ausgestattet und detektiert mit Hilfe eines Kamerabildes die ROI (Region of Interest) im Lachsei. Das so ermittelte Koordinatenpaar definiert den Mittelpunkt der anschließenden OCT-Messung zur Anpassung des Abstandes zwischen Messkopf und ROI (Messbereich).

Nachfolgend beginnt die tomografische Erfassung der Zielstruktur mit einem Betrachtungsfeld von 2 mm. Der aufgenommene Tomografiedatensatz wird online ausgewertet, so dass das Ergebnis unmittelbar nach der Messung zur Verfügung steht. Die benötigte Zeit für die Untersuchung und Auswertung von
5 500 Lachseiern mit Bestimmung der prozentualen Befruchtungsrate beträgt 30 min.

Die Lachseier können ohne zusätzliche Keimbelastung wieder dem Inkubator zugeführt und weiter inkubiert werden.

10

Es wurde eine durchschnittliche Befruchtungsrate von 94 % ermittelt, damit kann extrapoliert werden, dass auch 94 % der im Behälter befindlichen 20-fachen Menge an Lachseiern befruchtet sind.

15 Das Untersuchungsergebnis an den Lachseiern ist damit automatisch erreicht und unabhängig von einem Operator/Bediener und damit reproduzierbar gesichert.

20

25

30

Patentansprüche

1. Verfahren zur Untersuchung von Fischeiern, dadurch gekennzeichnet, dass eine Probe mit Fischeiern entnommen und in einen Probenhalter gegeben wird, wobei die Fischeier durch den Probenhalter separiert und vereinzelt werden, dass die einzelnen Fischeier in dem Probenhalter mittels optischer Kohärenztomografie untersucht werden, wobei der Messkopf des optischen Kohärenztomografiesystems beabstandet über jedes Fischei so positioniert wird, dass sich im Messbereich mindestens bereichsweise die Fischeikeimscheibe und/oder die embryonale Struktur des Fischeis befindet und in dem Messbereich die Daten der Fischeikeimscheibe und/oder embryonalen Struktur des Fischeis aufgenommen und nachfolgend die ermittelten Daten ausgewertet und mindestens der Entwicklungszustand und/oder Befruchtungszustand jedes untersuchten Fischeies der Probe festgestellt wird.

15

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Fischeier der Probe in einzelne Öffnungen des Probenhalters eingebracht werden, die jeweils nur ein Fischei aufnehmen und weiterhin durch ihre Größe die Rotation des Fischeis in der Öffnung ermöglichen.

20

3. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Flüssigkeit in den Probenhalter gegeben wird, wobei für alle untersuchten Fischeier ein gleicher Flüssigkeitsüberstand über jedem Fischei realisiert wird.

25

4. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mittels mindestens einer Kamera der jeweils konkrete Abstand zwischen Fischeikeimscheibe und/oder embryonaler Struktur und Messkopf des optischen Kohärenztomografiesystems und/oder der Messbereich für den Messkopf des optischen Kohärenztomografiesystems ermittelt wird.

30

5. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mittels des Messkopfes des optischen Kohärenztomografiesystems und einer Kamera und/oder eines Abstandssensors über jedem Fischei der konkrete Abstand zum Fischei gemessen und der Zustand der Fischeikeimscheibe und/oder der embryonalen Struktur des Fischeies insgesamt, anhand der spektralen Daten und/oder eines rekonstruierten Bilddatensatzes, eines Bildes analysiert und/oder dokumentiert wird.
- 10 6. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Probe eine proportionale Menge aus der Gesamtmenge entnommen wird und aus den ermittelten Daten über den Befruchtungszustand jedes untersuchten Fischeies der Probe proportional der Entwicklungszustand und/oder Befruchtungszustand der Gesamtmenge festgestellt wird.
- 15 7. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Flüssigkeit eine Flüssigkeit eingesetzt wird, in der die Fischeier überleben.
- 20 8. Vorrichtung zur Untersuchung von Fischeiern, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Probenhalter in einem optischen Kohärenztomografiesystem entweder fest positioniert oder in X- und/oder Y-Richtung beweglich unter einem Messkopf des optischen Kohärenztomografiesystems angeordnet ist und dass
- 25 der Probenhalter einen Träger für eine Flüssigkeit und eine Platte mit einer Vielzahl an Öffnungen aufweist, wobei die Platte vom Träger entfernbar ist, vom Boden des Trägers beabstandet angeordnet ist und im Falle des Vorhandensein von Flüssigkeit im Träger immer vollständig innerhalb der Flüssigkeit angeordnet ist, und wobei die Öffnungen in der Platte in Form und Größe an die
- 30 zu untersuchenden Fischeier so angepasst sind, dass durch die Öffnungen in der Platte die Fischeier einerseits örtlich an der Position der Öffnung gehalten und andererseits eine drehende Bewegung der Fischeier in der Öffnung realisierbar ist, die Öffnungen in der Platte vom Rand des Trägers außerhalb

des Randwinkels der Flüssigkeit angeordnet sind und die in den Öffnungen befindlichen Fischeier für das optische Kohärenztomografiesystem frei zugänglich sind.

5

9. Vorrichtung nach Patentanspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Höhe des Trägers mindestens größer als der maximale Durchmesser der zu untersuchenden Fischeier zuzüglich der überstehenden Flüssigkeit ist.

10

10. Vorrichtung nach Patentanspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Öffnungen einen im Wesentlichen runden Durchmesser aufweisen, der größer als der maximale Durchmesser der jeweils zu untersuchenden Fischeier ist.

15

11. Vorrichtung nach Patentanspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenhalter unter dem Messkopf des optischen Kohärenztomografiesystems und mindestens einer Kamera und/oder mindestens einem Abstandssensor beweglich angeordnet ist.

20

12. Verwendung der Vorrichtung nach Patentanspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass zur Beurteilung des Entwicklungszustandes und/oder des Befruchtungszustandes von Fischeiern das optische

25 Kohärenztomografiesystem mit dem Probenhalter verwendet wird.

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE2018/000202

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A01K 67/02(2006.01)i; A01K 61/17(2017.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A01K; G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FANNY MOSES GLADYS ET AL. "Developmental and morphological studies in Japanese medaka with ultra-high resolution optical coherence tomography" <i>BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS</i> , United States, Vol. 6, No. 2, 06 January 2015 (2015-01-06), page 297 DOI: 10.1364/BOE.6.000297 ISSN: 2156-7085, XP055516293	1-7
Y	the whole document	8-12
Y	WO 2011141559 A1 (UNIV PADOVA [IT]; JORI GIULIO [IT]; MAGARAGGIA MICHELA [IT]; CAMERIN M) 17 November 2011 (2011-11-17) page 7, line 18 - page 9, line 2 claim 10 figure 3	8-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 November 2018		30 November 2018
Name and mailing address of the ISA/EP		Authorized officer
European Patent Office p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk Netherlands Telephone No. (+31-70)340-2040 Facsimile No. (+31-70)340-3016		Kiyak, Ismail Utku Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/DE2018/000202

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2011141559	A1	17 November 2011	IT	1400911	B1	02 July 2013
				WO	2011141559	A1	17 November 2011
.....							

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. A01K67/02 A01K61/17 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) A01K G01N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FANNY MOSES GLADYS ET AL: "Developmental and morphological studies in Japanese medaka with ultra-high resolution optical coherence tomography", BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS, Bd. 6, Nr. 2, 6. Januar 2015 (2015-01-06), Seite 297, XP055516293, United States ISSN: 2156-7085, DOI: 10.1364/BOE.6.000297	1-7
Y	das ganze Dokument	8-12
Y	WO 2011/141559 A1 (UNIV PADOVA [IT]; JORI GIULIO [IT]; MAGARAGGIA MICHELA [IT]; CAMERIN M) 17. November 2011 (2011-11-17) Seite 7, Zeile 18 - Seite 9, Zeile 2 Anspruch 10 Abbildung 3	8-12
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
22. November 2018		30/11/2018
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Kiyak, Ismail Utku

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2018/000202

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2011141559 A1	17-11-2011	IT 1400911 B1	02-07-2013
		WO 2011141559 A1	17-11-2011
