

Ringversuch zum Nachweis von Trichinellen in Fleisch (2009)

Bericht des Nationalen Referenzlabors für Trichinellose

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)
Fachgruppe 45
Diedersdorfer Weg 1
12277 Berlin

Dr. Anne Mayer-Scholl
Tel.: 030-18412 2057
e-mail: anne.mayer-scholl@bfr.bund.de

Frau Sabine Reckinger
Tel.: 030-18412-2073
e-mail: sabine.reckinger@bfr.bund.de

Dr. Karsten Nöckler
Tel.: 030-18412 2053
Fax: 030-18412-2000
e-mail: karsten.noeckler@bfr.bund.de

1 Einleitung

Nach der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz (Artikel 4-6, 12) tragen die Behörden Sorge, dass amtliche Kontrollen wirksam und angemessen durchgeführt werden. Hierbei sind Anforderungen an Personal und Laborausstattung einzuhalten. Die amtliche Trichinenuntersuchung nach VO (EG) Nr. 2075/2005 darf ab dem 31. Dezember 2009 gemäß Art. 1 und 18 der VO (EG) Nr. 2076 nur von dafür akkreditierten Laboratorien bzw. deren Personal erfolgen. Die Akkreditierung erfolgt nach EN ISO 17025.

Im Rahmen der Akkreditierung sind Trichinenuntersuchungsstellen, die im Auftrag der zuständigen Veterinärbehörden die Untersuchung auf Trichinellen am Schlachttierkörper durchführen, verpflichtet, regelmäßig an Trichinen-Ringversuchen teilzunehmen.

Deshalb bestand auch im Jahr 2009 ein großes Interesse am Ringversuch des Nationalen Referenzlabors für *Trichinella* zum Nachweis von Trichinellen im Fleisch. Aufgrund der großen Teilnehmerzahl wurde der Ringversuch in zwei, um eine Woche versetzten, Durchgängen durchgeführt.

Wie im vergangenen Jahr wurde eine abgezählte Larvenanzahl in jede verschickte Fleischprobe verbracht und der Toleranzbereich unter Bestimmung des „z-score“ ermittelt.

Die Auswertung der Ergebnisse des Ringversuches erfolgte wieder nach qualitativen und quantitativen Aspekten. Zu diesem Zweck wurde für jeden Teilnehmer der Anteil der richtigen, falsch-negativen und falsch-positiven Befunde ermittelt und die Zahl der in den positiven Proben nachgewiesenen Larven mit dem nach der ISO 13528 (Ausgabe 2005) festgelegten Sollwert verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Muskelproben

Zur Gewinnung des trichinösen Fleisches wurde ein Schwein (Rasse Deutsches Edelschwein) mit ca. 40.000 *Trichinella spiralis*-Muskelarven (Referenzstamm ISS 003 aus der Muskulatur eines infizierten Meerschweinchens) infiziert. 16 Wochen nach der Infektion wurde das Schwein elektrisch betäubt und entblutet. Nach der Probenentnahme wurden die zerlegten Teile im Kühlraum bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Es wurden Proben von 9 verschiedenen Muskeln nach dem Prinzip der künstlichen Verdauung mit dem Magnetrührverfahren auf *Trichinella*-Larven untersucht und die Larven-Befallsrate, d.h. die Anzahl der Larven pro g Muskulatur (LpG) aus jeweils 100 g der Probe bestimmt. Für die untersuchten Muskelpartien wurden folgende Befallsraten ermittelt: Zwerchfellpfeiler 1148, Zunge 869, Kaumuskulatur 540, Schulter 297, Vorderbein 486, Bauch 475, Zwischenrippe 183, Kotelett 132 und Schinken 217 LpG.

2.2 Ringversuchsmaterial

Zur Herstellung der *Trichinella*-positiven Proben wurden für jeden Durchgang *T. spiralis* Larven mittels Digestion aus dem Fleisch des Koteletts des infizierten Schweins gewonnen. Negatives Fleisch wurde mit einer Moulinette zerkleinert und in 10 g große Klopse geformt. Eine genau abgezählte Anzahl Larven wurde mit einer Pipette in die Klopse verbracht.

Für den Ringversuch wurden pro Teilnehmer insgesamt 6 Proben vorbereitet. Bei diesen Proben handelte es sich um 4 *Trichinella*-positive und 2 *Trichinella*-negative Proben (Tabelle 1).

Tabelle 1: Status der Proben für den Ringversuch

Probe Nr.	Status	Sollwert (LpG)
1	negativ	0
2	positiv	20
3	positiv	10
4	positiv	6
5	negativ	0
6	positiv	15

Von jeder Probe wurde ein 10 g Klops in einen Plastikbeutel verpackt und entsprechend nummeriert. Alle Proben wurden bis zum Versand im Kühlraum bei 4°C gelagert. Die Probe sollte mit 90 g Füllmaterial (Schweinefleisch) pro Ansatz untersucht werden, jedoch ohne dass die Ringversuchsproben nochmals im Mixer zerkleinert werden sollten. Die Probe sollte direkt in die Digestionsflüssigkeit gegeben und am Rand des Becherglases leicht zerdrückt werden.

Die quantitative Auswertung zur ermittelten Larvenzahl erfolgte nach der ISO 13528 (Ausgabe 2005) auf der Grundlage der Berechnung des „z-score“. Der „z-score“ als Standardparameter ermöglicht die Vergleichbarkeit der verschiedenen Probenansätze. Für die Probe 4 (6 Larven) wurde eine tolerierbare Abweichung von 50 % zugrunde gelegt. Für die Proben 2 (20 Larven), 3 (10 Larven) und 6 (15 Larven) betrug die tolerierbare Abweichung 30 % (Tabelle 2).

Tabelle 2: Bewertung der quantitativen Ergebnisse nach dem z-score.

Bewertung der quantitativen Ergebnisse für die Probe 4 (Sollwert 6 Larven)

(n) Larven	≤2	3	4	5	6	7	8	9	≥10
z-score	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4

Bewertung der quantitativen Ergebnisse für die Probe 3 (Sollwert 10 Larven)

(n) Larven	≤6	7	8	9	10	11	12	13	≥14
z-score	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4

Bewertung der quantitativen Ergebnisse für die Probe 6 (Sollwert 15 Larven)

(n) Larven	≤10	11	12	13	14 -16	17	18	19	≥20
z-score	-3,3	-2,7	-2	-1,3	+0,7	1,3	2	2,7	3,3

Bewertung der quantitativen Ergebnisse für die Probe 2 (Sollwert 20 Larven)

(n) Larven	≤13	14	15	16	17 - 23	24	25	26	≥27
z-score	-3,5	-3	-2,5	-2	+1,5	2	2,5	3	3,5

weiß = Ergebnis liegt im Toleranzbereich ($-2 \leq z \leq 2$)

hell grau = Ergebnis liegt im grenzwertigen Bereich ($-3 \leq z < -2$ und $2 < z \leq 3$)

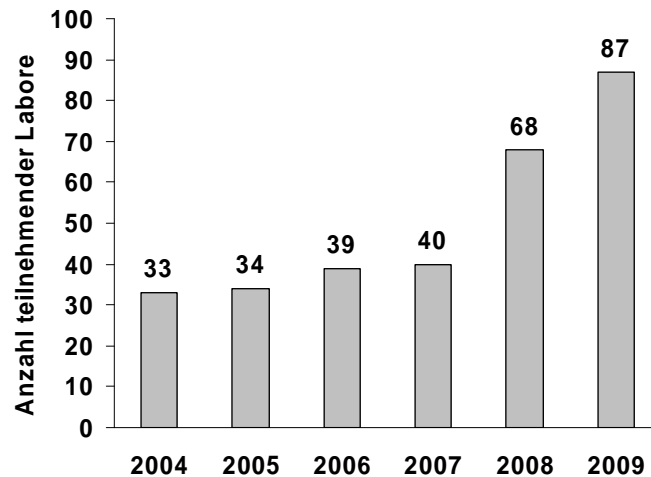
dunkel grau = Ergebnis liegt nicht im Toleranzbereich ($z < -3$ und $z > 3$)

2.3 Ringversuchsteilnehmer

Insgesamt nahmen 87 Labore aus allen 16 Bundesländern an dem Ringversuch teil. Dabei handelte es sich um 1 bis 24 Labore je Bundesland. Von allen Laboren wurden die Ergebnisse im vorgegebenen Zeitraum übersandt.

Seit 2004 ist die Anzahl der Ringversuchsteilnehmer stetig gestiegen und lag dieses Jahr bei 87 Laboren (Abbildung 1).

Abbildung 1: Anzahl teilnehmender Labore zwischen 2004-2009



Den Ringversuchsteilnehmern wurde der Versand der Proben etwa 4 Wochen im Voraus angekündigt und nähere Informationen zur Untersuchung der Proben und Auswertung gegeben. Der Versand der Proben erfolgte in speziellen Gefahrgutbehältern (Bio-Bottle 2,4l, Klasse 6.2) mit einer Versandfirma. Die Proben waren mit einer für die Trichinenuntersuchung beim Schwein vorgeschriebenen Methode der künstlichen Verdauung zu untersuchen. Innerhalb von 4 Wochen nach dem Erhalt der Proben mussten die Ergebnisse auf einem vorbereiteten Formblatt an das BfR zurückgesendet werden.

2.4 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung erfolgte für jeden Teilnehmer nach der Anzahl der richtig erkannten *Trichinella*-positiven bzw. -negativen Muskelproben sowie der Zahl der falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnisse (qualitative Auswertung). Weiterhin wurden die Ergebnisse jedes Teilnehmers zur Anzahl der Larven mit dem errechneten Toleranzbereich verglichen (quantitative Auswertung).

3. Ergebnisse

3.1 Qualitative Auswertung

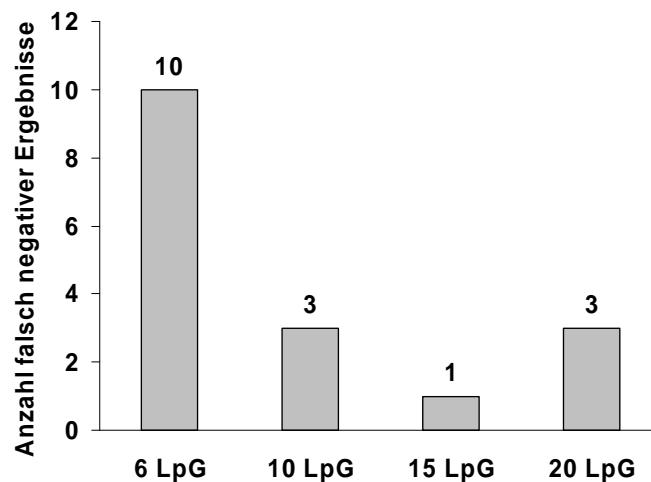
Alle Teilnehmer führten das Magnetrührverfahren nach dem Prinzip der künstlichen Verdauung durch. Bei 54 % aller Teilnehmer erfolgte die Auswertung der Proben mit einem Stereomikroskop. 45 % der Teilnehmer benutzten ein Trichinoskop, ein Teilnehmer machte keine Angaben.

Von den zu bewertenden 348 *Trichinella*-positiven Proben wurden Larven in 330 Proben (95 %) gefunden. 17 Ergebnisse erwiesen sich als falsch-negativ (4,9 %). Eine positive Pro-

be wurde nicht untersucht. Von den 174 negativen Proben wurden 172 (98,9 %) korrekt und 2 als falsch-positiv (1,1 %) beurteilt.

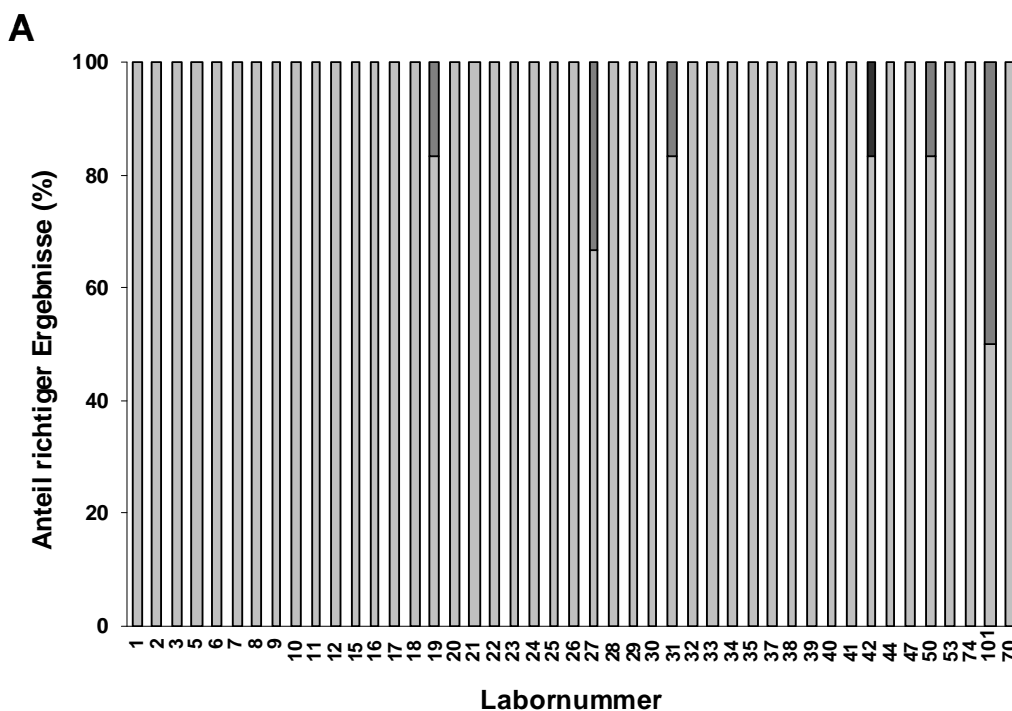
Bei den im Magnetrührverfahren ermittelten 17 falsch-negativen Ergebnissen handelte es sich in 10 Fällen um die Probe 4 (Sollwert 6 LpG), in 3 Fällen jeweils um die Proben 2 und 3 (Sollwert 20 bzw. 10 LpG), und in einem Fall um die Probe 6 (Sollwert 15 LpG) (Abbildung 2).

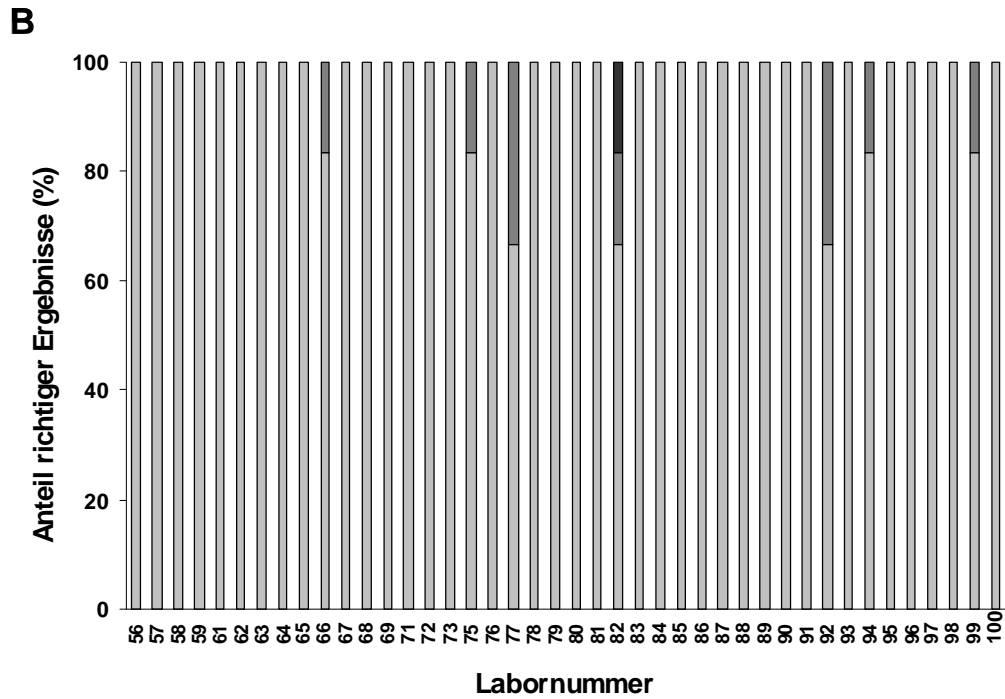
Abbildung 2: Falsch-negative Ergebnisse für die Probe 4 (6 LpG), 3 (10 LpG), 6 (15 LpG) und 2 (20 LpG)



Nach Auswertung der Einzelergebnisse haben 74 Labore (85 %) alle 6 Proben korrekt als *Trichinella*-positiv bzw. -negativ erkannt, siehe Abbildung 3A (1. Durchgang) und Abbildung 3B (2. Durchgang). Bei dem Teilnehmer 85 wurde die Probe 2 nicht mitbewertet, da die Probe auf Grund technischer Schwierigkeiten nicht ausgezählt werden konnte. Von 7 Laboren wurde eine Probe, von 4 Laboren mehr als eine Probe falsch-negativ beurteilt. Ein Labor hatte ein falsch-positives Ergebnis. Ein Labor beurteilte jeweils eine Probe als falsch-negativ bzw. falsch-positiv.

Abbildung 3 A und B: Prozentualer Anteil der von den Teilnehmern richtig erkannten Proben





Zeichenerklärung: schwarz = falsch-negativ; dunkel grau = falsch-positiv, hell grau = richtig erkannt

Die Übersicht für die Ergebnisse aller Labore ist in der Tabelle 3, geordnet nach der laufenden Nummer der Probe dargestellt. Die erste Tabelle stellt die Ergebnisse zur Anzahl der Larven der Labors des ersten Durchgangs, die zweite Tabelle die Ergebnisse des um eine Woche versetzten zweiten Durchgangs dar.

Tabelle 3: Ergebnisse der 87 Labore zur Anzahl der Larven in den Proben 1-6

Probe	1	2	3	4	5	6	richtig	falsch negativ	falsch positiv
Sollwert	0	20	10	6	0	15			
Labor	Dig	Dig	Dig	Dig	Dig	Dig			
1	0	17	9	3	0	14	6	0	0
2	0	13	7	6	0	13	6	0	0
3	0	18	10	2	0	18	6	0	0
5	0	20	10	6	0	10	6	0	0
6	0	9	8	6	0	14	6	0	0
7	0	15	9	4	0	12	6	0	0
8	0	3	1	4	0	13	6	0	0
9	0	9	3	4	0	14	6	0	0
10	0	9	8	5	0	6	6	0	0
11	0	15	7	3	0	15	6	0	0
12	0	17	10	6	0	15	6	0	0
15	0	15	8	5	0	11	6	0	0
16	0	17	8	5	0	18	6	0	0
17	0	8	1	3	0	5	6	0	0
18	0	15	5	6	0	10	6	0	0
19	0	10	4	0	0	7	5	1	0
20	0	9	5	4	0	10	6	0	0
21	0	6	8	4	0	9	6	0	0
22	0	18	7	3	0	9	6	0	0
23	0	18	5	3	0	10	6	0	0
24	0	10	7	1	0	7	6	0	0
25	0	9	7	6	0	10	6	0	0
26	0	17	5	4	0	8	6	0	0
27	0	12	0	0	0	4	4	2	0
28	0	5	4	1	0	5	6	0	0
29	0	5	3	4	0	2	6	0	0
30	0	12	6	3	0	10	6	0	0
31	0	23	5	0	0	12	5	1	0
32	0	15	9	6	0	6	6	0	0
33	0	8	7	2	0	3	6	0	0
34	0	14	6	5	0	10	6	0	0
35	0	14	6	3	0	7	6	0	0
37	0	15	9	3	0	14	6	0	0
38	0	10	4	1	0	7	6	0	0
39	0	14	10	5	0	8	6	0	0
40	0	14	7	3	0	9	6	0	0
41	0	1	4	3	0	15	6	0	0
42	2	19	8	6	0	9	5	0	1
44	0	18	9	6	0	11	6	0	0
47	0	20	8	4	0	12	6	0	0
50	0	5	2	0	0	5	5	1	0
53	0	13	6	1	0	11	6	0	0
74	0	7	3	2	0	6	6	0	0
101	0	0	0	0	0	4	3	3	0
70	0	19	11	4	0	10	6	0	0

Probe	1	2	3	4	5	6	richtig	falsch negativ	falsch positiv
Sollwert	0	20	10	6	0	15			
Labor	Dig	Dig	Dig	Dig	Dig	Dig			
56	0	20	10	5	0	15	6	0	0
57	0	13	2	2	0	10	6	0	0
58	0	13	2	4	0	4	6	0	0
59	0	12	9	3	0	4	6	0	0
61	0	13	9	4	0	13	6	0	0
62	0	17	8	3	0	7	6	0	0
63	0	19	8	5	0	11	6	0	0
64	0	2	1	2	0	1	6	0	0
65	0	18	6	6	0	12	6	0	0
66	0	9	3	0	0	5	5	1	0
67	0	10	2	4	0	7	6	0	0
68	0	15	8	4	0	10	6	0	0
69	0	4	7	5	0	9	6	0	0
71	0	19	6	5	0	14	6	0	0
72	0	20	10	5	0	9	6	0	0
73	0	19	9	6	0	9	6	0	0
75	0	0	4	3	0	5	5	1	0
76	0	12	8	5	0	10	6	0	0
77	0	20	8	0	0	0	4	2	0
78	0	7	3	4	0	9	6	0	0
79	0	16	1	3	0	14	6	0	0
80	0	13	10	5	0	11	6	0	0
81	0	15	5	5	0	7	6	0	0
82	7	5	11	0	0	6	4	1	1
83	0	17	8	6	0	9	6	0	0
84	0	6	6	2	0	7	6	0	0
85	0	-	4	3	0	12	5	0	0
86	0	9	1	2	0	11	6	0	0
87	0	10	6	5	0	7	6	0	0
88	0	4	1	4	0	6	6	0	0
89	0	16	2	3	0	14	6	0	0
90	0	15	8	6	0	14	6	0	0
91	0	17	9	6	0	15	6	0	0
92	0	0	0	2	0	2	4	2	0
93	0	8	3	7	0	13	6	0	0
94	0	8	3	0	0	6	5	1	0
95	0	12	7	2	0	9	6	0	0
96	0	17	9	4	0	6	6	0	0
97	0	4	15	5	0	3	6	0	0
98	0	19	9	5	0	8	6	0	0
99	0	16	8	0	0	12	5	1	0
100	0	6	2	1	0	4	6	0	0
Mittelwert	0.1	12.3	6.1	3.5	0.0	9.2			
St. abw.	0.8	5.6	3.2	1.9	0.0	3.9			
Tol.-bereich	0	14-26	7-13	3-9	0	11-19			

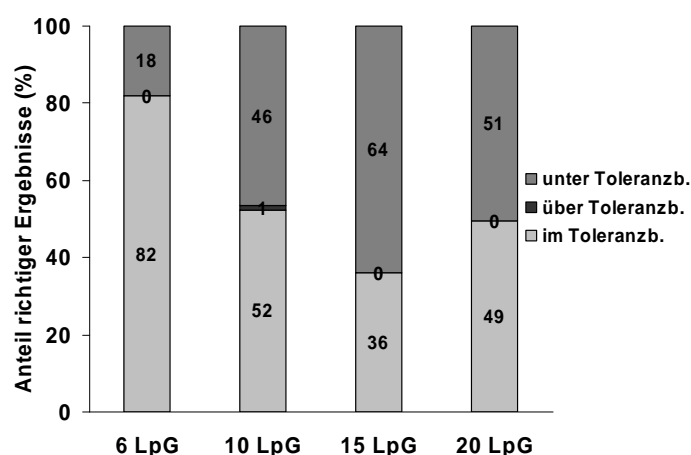
Zeichenerklärung: dunkel grau = falsch-negative oder falsch-positive Ergebnisse; hell grau = Larvenzahl liegt unterhalb des Toleranzbereiches; grau unterstrichen = Larvenzahl liegt oberhalb des Toleranzbereiches.

3.2 Quantitative Auswertung

Für die jeweiligen positiven Proben lag der Mittelwert der Labore für die Larvenanzahl unter dem Sollwert, wobei die Standardabweichung bei der Probe 2 (20 LpG) erwartungsgemäß am höchsten war (Tabelle 3).

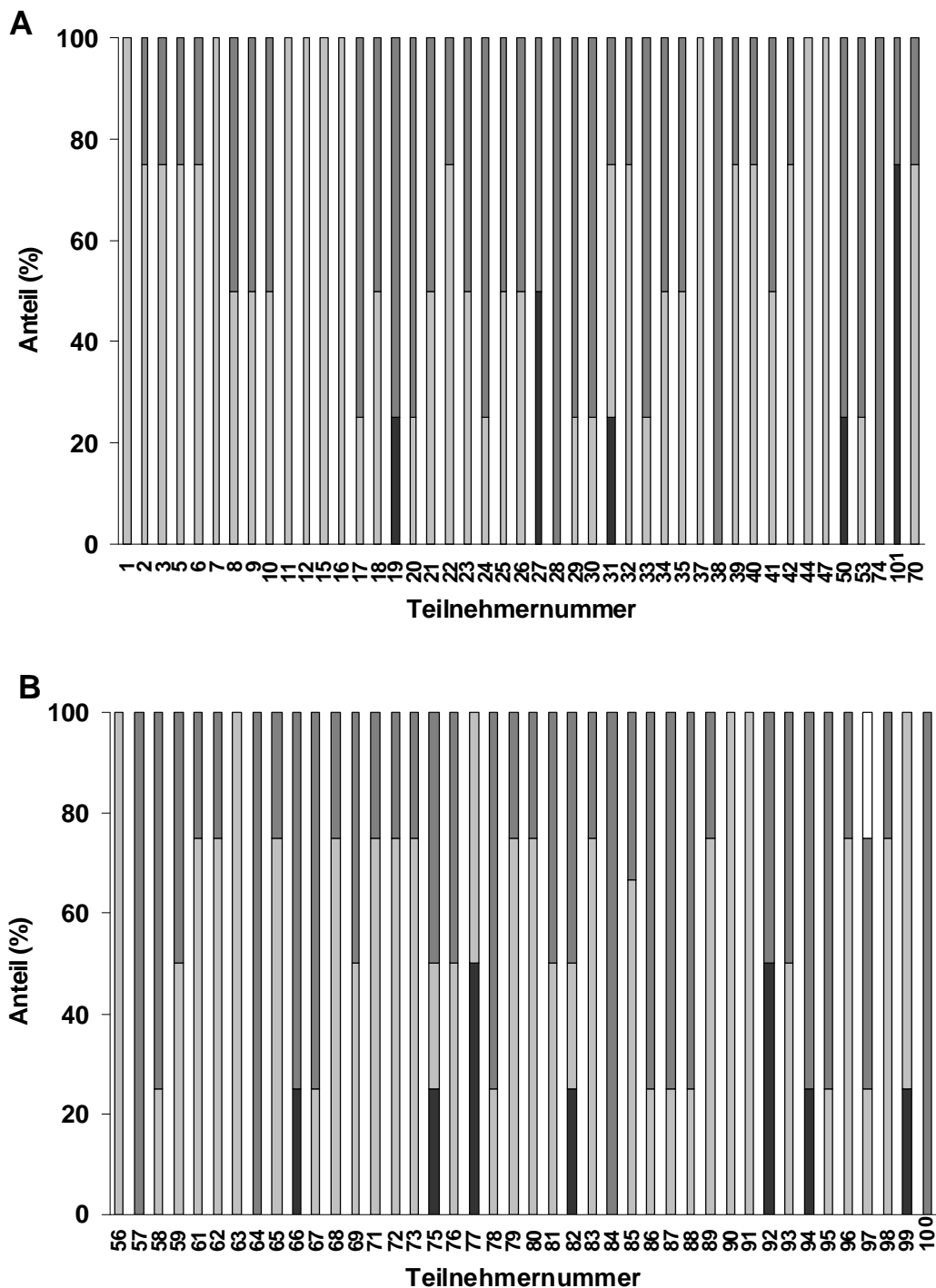
Von den insgesamt 330 erkannten *Trichinella*-positiven Proben lag die ermittelte Larvenanzahl in 179 Fällen (54,2 %) im berechneten Toleranzbereich. Die ermittelte Larvenanzahl lag für 1 Probe (0,3 %) über und für 150 Proben (45,5 %) unter dem Toleranzbereich. Dabei war für Probe 6 (15 LpG) der Anteil der Ergebnisse, für welche die Anzahl der ermittelten Larven außerhalb des Toleranzbereiches lag, am höchsten (Abbildung 4).

Abbildung 4: Anteil der *Trichinella*-positiven Proben, für welche die Larvenanzahl im Toleranzbereich, darüber oder darunter lag



Nach den Ergebnissen der quantitativen Auswertung für die einzelnen Labore hatten nur 13 Teilnehmer (15 %) alle positiven Proben qualitativ richtig erkannt und die ermittelte Larvenanzahl für diese *Trichinella*-positiven Proben lag innerhalb des Toleranzbereichs. Bei 40 Laboren (46 %) befand sich die ermittelte Larvenanzahl bei einer oder zwei der als richtig positiv erkannten Proben außerhalb des Toleranzbereichs. Im Gegensatz dazu war bei 34 Laboren (39 %) bei 3 oder mehr *Trichinella*-positiven Proben die Larvenanzahl außerhalb des Toleranzbereiches oder es handelte sich um falsch-negative Proben (Abbildung 5A und 5B).

Abbildung 5: Ergebnisse zur Larvenanzahl der 4 positiven Proben für die einzelnen Labore

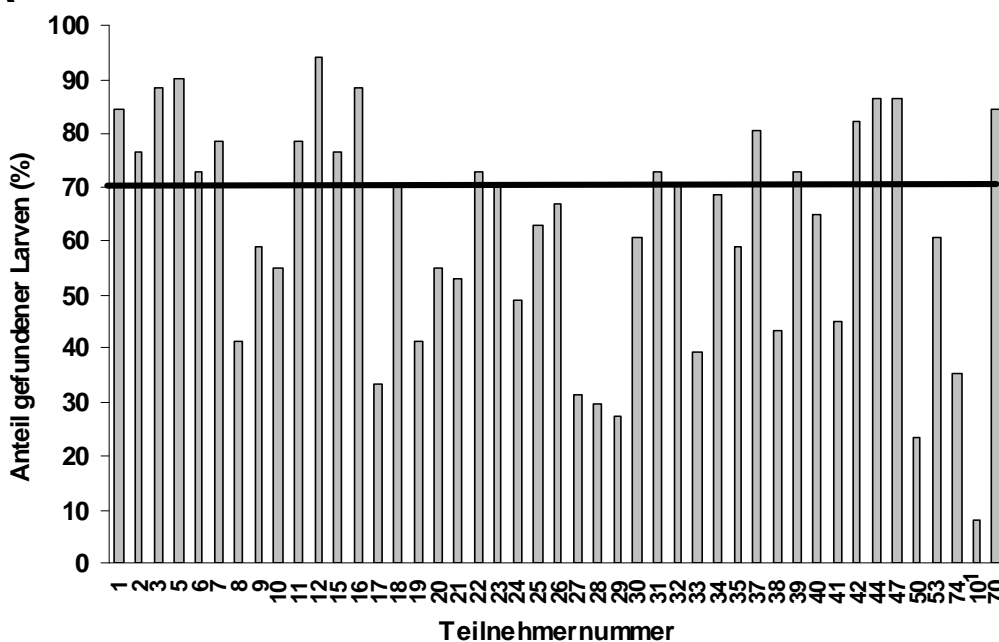


Zeichenerklärung: schwarz = falsch-negative Ergebnisse; weiß = Larvenzahl liegt oberhalb des Toleranzbereiches; dunkel grau = Larvenzahl liegt unterhalb des Toleranzbereiches, hell grau = Larvenzahl liegt innerhalb des Toleranzbereiches

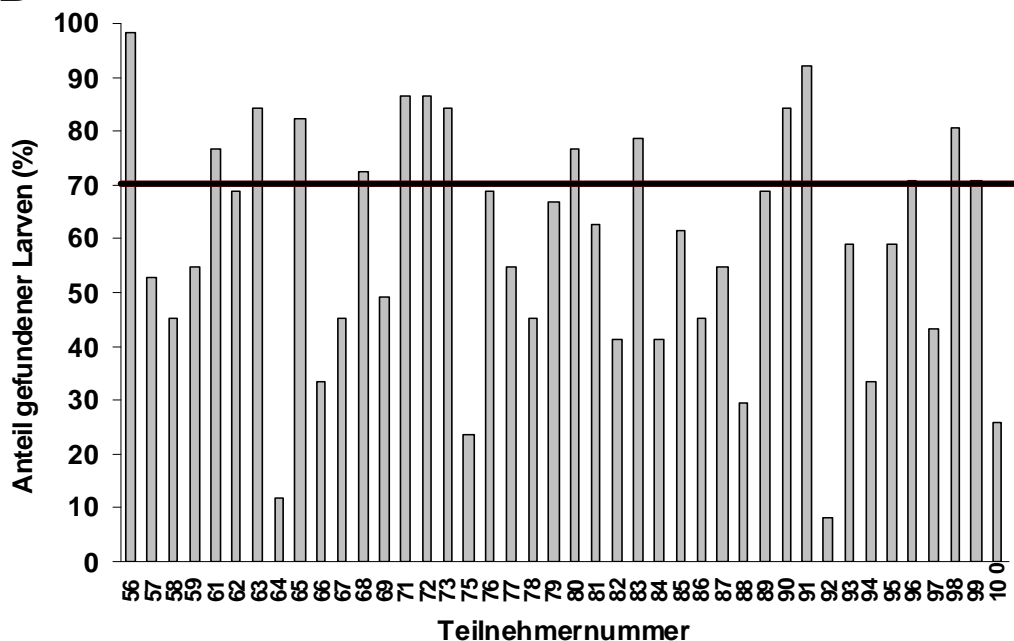
Nach einem allgemeinen Richtwert sollten mindestens 70 % aller in die Fleischklopse verbrachter Larven identifiziert werden. Die Gesamtzahl aller Larven in den vier positiven Proben lag bei 51 Larven. Von den 87 Teilnehmern konnten nur 36 Labore (41 %) mindestens 70 % der Larven (> 35 Larven) identifizieren (Abbildungen 6A und B).

Abbildung 6: Anteil gefundener Larven aller positiven Proben. Der „cut-off“ (schwarze Linie) liegt bei 70 %

A



B



4 Diskussion

Die Zahl der am Ringversuch 2009 teilnehmenden Labore stieg weiter an und verdeutlicht das Interesse zur Teilnahme an Qualitätskontrollen im Rahmen der Trichinenuntersuchung.

2008 hatten nur 57 % der Labore alle Proben korrekt als *Trichinella*-positiv bzw. -negativ beurteilt. Im Vergleich zum Vorjahr fiel 2009 der Anteil der Labore mit 85 % wesentlich höher aus. Leider verringerte sich der Anteil der quantitativ richtig bewerteten positiven Proben auf 54 %. Auch erkannten nur 41 % aller Teilnehmer mehr als 70 % der Larven.

Beim Auftreten von falsch-negativen Ergebnissen oder zu wenig nachgewiesenen Larven sollte eine Fehleranalyse erfolgen, um die Sensitivität der Nachweismethode zu verbessern. Folgende Ursachen sollten in Betracht gezogen werden:

- Verwechslung der Proben.
- Es wurde nicht die vorgeschriebene Untersuchungsmenge für die Untersuchung eingesetzt. Sofern sich das Gewicht der Probe durch Flüssigkeitsverlust verringerte, hat dieses keinen Einfluss auf die Larvenzahl im Fleisch.
- Die künstliche Verdauung der Proben verlief nicht optimal (z.B. falsche Konzentration von Salzsäure und Pepsin, überlagertes Pepsin, Unterschreitung der vorgeschriebenen Verdauungszeit, Nichteinhaltung der Temperatur), so dass unverdautes Restmaterial auf dem Sieb zurückgeblieben ist.
- Die vorgeschriebene Zeit, welche für die Sedimentation der Larven erforderlich ist, wurde nicht eingehalten.
- Die Sedimentationszeit in dem 50 ml-Zentrifugenglas war zu kurz.
- Die Verdauungsflüssigkeit wurde ungenügend gewaschen und Larven wurden durch die zu starke Trübung übersehen.
- Die Verdauungsflüssigkeit in der skalierten Petrischale wurde unvollständig und/oder zu schnell mit dem Mikroskop durchmustert, so dass Larven übersehen wurden.
- Die Kenntnisse zum Aussehen des Untersuchungsgegenstandes, d.h. zur Form und Größe der *Trichinella*-Larven sind mangelhaft.

Ursache für zu hohe Larvenzahlen (8 Labore) könnte sein, dass Larven durch unsystematisches Durchmustern der Verdauungsflüssigkeit mehrfach gezählt wurden oder dass Artefakte als vermeintliche Larven identifiziert wurden. Letzteres könnte auch die Ursache für falsch-positive Ergebnisse sein. Als Grund für falsch-positive Ergebnisse kommt z.B. auch eine unzureichende Reinigung der vorher mit Trichinenlarven behafteten Gerätschaften in Frage.

Trotz der Umstellung von vakuumverpackten Ringversuchsproben (2008) zu der einfachen Verpackung in Plastikbeuteln, wurden von 5 Laboren Schwierigkeiten bei der Verarbeitung der Proben gemeldet. Die Ringversuchsproben sollten ohne nochmaliges Zerkleinern direkt in die Digestionsflüssigkeit gegeben und am Rand des Becherglases zerdrückt werden. Die Proben ließen sich bei den 5 Teilnehmern nur sehr unvollständig zerdrücken und die Konsistenz des Materials war kompakt und zusammenhängend. Die Verdauung des Probenmaterials wurde im Vergleich zum Füllmaterial als schlecht beurteilt. Ursachen könnten ein Nichteinhalten der Temperatur der Digestionsflüssigkeit sein sowie das Zerdrücken der Probe in zu großen Volumina.