

# Laborvergleichuntersuchung zum Nachweis von Trichinellen in Fleisch (2018/II)

Bericht des Nationalen Referenzlabors für *Trichinella*

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)  
Fachgruppe FGr 45 – Diagnostik und Erregercharakterisierung  
Diedersdorfer Weg 1  
12277 Berlin

## 1 Einleitung

Die Trichinellose ist eine lebensmittelbedingte Zoonose, die durch Parasiten der Gattung *Trichinella* hervorgerufen wird. Eine humane Infektion ist im Anfangsstadium durch unspezifische Symptome wie Mattigkeit, intermittierendes hohes Fieber, Schlaflosigkeit, Durchfall und Erbrechen gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf der Erkrankung können Muskelverhärtungen, Muskelschmerzen und Ödeme im Gesicht auftreten. In Deutschland ist die Trichinellose des Menschen eine meldepflichtige Erkrankung.

Ursache der Erkrankung beim Menschen ist der Verzehr von Fleisch infizierter Tiere, welches entweder nicht bzw. nicht ordnungsgemäß auf Trichinellen untersucht wurde oder einem unzureichenden Inaktivierungsverfahren unterzogen wurde.

Mit der neuen EU-Kontroll-Verordnung (EU) 2017/625 wird bei Erfüllung bestimmter Anforderungen die Akkreditierungspflicht für Trichinenuntersuchungsstellen (TUS) aufgehoben. Gemäß Art. 39, Abs. 1(a) können auch nicht akkreditierte Einrichtungen als Trichinenuntersuchungsstellen benannt werden, sofern sie regelmäßig und mit zufriedenstellendem Ergebnis an Laborvergleichsuntersuchungen (LVU), die von den Nationalen Referenzlaboratorien ausgerichtet werden, teilnehmen. Dies hat grundlegende Änderungen im Hinblick auf die Organisation und Koordinierung der LVU durch das NRL *Trichinella* zur Folge, da künftig mit einer sehr hohen Teilnehmerzahl (> 600 TUS) gerechnet werden muss. Die notwendigen Änderungen werden bis Ende der Übergangsphase schrittweise umgesetzt, sodass gewährleistet ist, dass alle TUS ab 2020 an den vom NRL *Trichinella* organisierten Laborvergleichsuntersuchungen (LVU) teilnehmen können.

Im März/April 2018 wurde bereits eine Laborvergleichsuntersuchung mit 109 Teilnehmern durchgeführt (2018/I). Da jedoch im Laufe des Jahres weitere Labore Bedarf meldeten, organisierte das NRL *Trichinella* eine zusätzliche LVU (2018/II). Für die LVU wurde eine abgezählte Larvenanzahl in jede positive Fleischprobe verbracht; der Toleranzbereich wurde für die jeweilige Larvenanzahl unter Bestimmung des „z-score“ ermittelt. Die Auswertung der Ergebnisse der Laborvergleichsuntersuchung erfolgte sowohl nach qualitativen als auch nach quantitativen Aspekten. Hierfür wurde für jedes teilnehmende Labor der Anteil der richtigen, falsch-negativen und falsch-positiven Befunde ermittelt sowie die Anzahl der in den positiven Proben nachgewiesenen Larven mit dem nach der ISO 13528 (Ausgabe 2016) festgelegten Sollwert verglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere und Muskelproben

Zur Gewinnung des trichinösen Fleisches wurde im Rahmen eines genehmigten Tierversuches ein Schwein (Rasse: DanZucht x Pietrain) mit ca. 40.000 *Trichinella spiralis* Muskellarven (Referenzstamm ISS 003 aus der Muskulatur eines infizierten Meerschweinchens) infiziert. 17 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 Larvenbefallsrate, 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: Zwerchfellpeiler

365, Zunge 810, Kaumuskulatur 440, Schulter 198, Vorderbein 240, Bauch 230, Zwischenrippe 94, Kotelett 56 und Schinken 176 LpG.

## 2.2 Material für die Laborvergleichsuntersuchung

Zur Herstellung der *Trichinella*-positiven Proben wurden für jeden Durchgang *T. spiralis* Larven mittels Digestion aus dem Muskelfleisch des infizierten Hausschweins 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 die LVU wurden pro Teilnehmer insgesamt 4 Proben vorbereitet. Bei diesen Proben handelte es sich um eine *Trichinella*-negative und drei *Trichinella*-positive Proben (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Status der Proben für die LVU**

Probe Nr.	Status	Sollwert (LpG)
1	positiv	16
2	positiv	3
3	negativ	0
4	positiv	7

Jede Probe wurde in eine verschließbare Kunststoffdose verpackt und entsprechend nummeriert. Alle Proben wurden bis zum Versand im Kühlraum bei 4°C gelagert. Jede kodierte Probe sollte mit 90 g Füllmaterial (negatives Schweinefleisch) pro Ansatz untersucht werden. Die Proben (10 g Klopse) sollten nicht nochmals im Mixer zerkleinert, sondern direkt in die Digestionsflüssigkeit gegeben und am Rand des Becherglases mit einer Gabel leicht zerdrückt werden.

Die quantitative Auswertung zur ermittelten Larvenzahl erfolgte nach der ISO 13528 (Ausgabe 2016) auf der Grundlage der Berechnung des z-score. Mit dem z-score wird die Anzahl der Standardabweichungen angegeben, um die der Messwert ober- oder unterhalb des Sollwertes liegt. Für die Probe 1 (Sollwert: 16 Larven) betrug die tolerierbare Abweichung 30 % und für die Probe 4 (Sollwert: 7 Larven) betrug die tolerierbare Abweichung 50 %. Für die Probe 2 mit nur 3 Larven ist der z-score nicht anwendbar, es sollte jedoch mindestens eine Larve gefunden werden; mehr als 4 Larven wurden bei dieser Probe als nicht tolerierbare Abweichung gewertet.

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

Bewertung der quantitativen Ergebnisse für die Probe 1 (Sollwert 16 Larven)

(n) Larven	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
z-score	-3,1	-2,5	-1,9	-1,3	-0,6	0	0,6	1,3	1,9	2,5	3,1

Bewertung des Ergebnisses für die Probe 2 (Sollwert 3 Larven)

(n) Larven	1 - 4
------------	-------

Bewertung der quantitativen Ergebnisse für die Probe 4 (Sollwert 7 Larven)

(n) Larven	3	4	5	6	7	8	9	10	11
z-score	-3,4	-2,6	-1,7	-0,9	0	0,9	1,7	2,6	3,4

- grün** = Ergebnis liegt im Toleranzbereich ( $-2 \leq z \leq 2$ )  
**gelb** = Ergebnis liegt im grenzwertigen Bereich ( $-3 \leq z < -2$  und  $2 < z \leq 3$ )  
**rot** = Ergebnis liegt nicht im Toleranzbereich ( $z < -3$  und  $z > 3$ )

Den Teilnehmern wurde der Versand der Proben etwa 6 Wochen im Voraus angekündigt und nähere Informationen zur Untersuchung der Proben und Auswertung übermittelt. 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 2 Wochen nach dem Erhalt der Proben mussten die Ergebnisse auf einem vorbereiteten Formblatt an das BfR zurückgesendet werden.

### 2.3 Teilnehmer

Insgesamt nahmen 10 Labore aus 7 Bundesländern an der Laborvergleichsuntersuchung teil. Ein Labor untersuchte 2 Probensätze. Da beide Ergebnisse separat in die Wertung einfließen, wurde dieses Labor zweimal gezählt, sodass die Teilnehmerzahl letztendlich 11 Labore betrug. Von einem Teilnehmer wurden die Ergebnisse erst nach Ende der Einsendefrist übersandt, die Ergebnisse wurden trotzdem in die Auswertung mit aufgenommen.

### 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 3 Teilnehmern (27 %) erfolgte die Auswertung der Proben mit einem Stereomikroskop, 8 Teilnehmer (73 %) benutzten ein Trichinoskop. Die durchschnittliche Anzahl der richtig gefundenen Larven lag bei der Untersuchung mit dem Stereomikroskop bei 16 Larven (von insgesamt 26 Larven), während mit dem Trichinoskop durchschnittlich 21 Larven gefunden wurden. Aufgrund des ungleichen Verhältnisses bei der Methodenwahl kann jedoch keine Aussage dazu getroffen werden, inwiefern die Untersuchungsmethode einen Einfluss auf das Ergebnis ausübte. In den vorherigen LVU wurde diesbezüglich jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Um die Vollständigkeit des Verdauungsvorgangs zu beurteilen, sollte die Menge des unverdauten Restmaterials auf dem Sieb bestimmt werden. Bei 9 Teilnehmern (82 %) wurde bei keiner Probe mehr als 5 g Restmaterial gefunden. Bei einem Labor wies eine untersuchte Probe eine erhöhte Menge unverdauten Materials auf (5,3 g); ein Labor machte bei zwei Proben hierzu keine Angaben. Auch sollte die Morphologie der gefundenen Larven beurteilt werden. Es wurde unterschieden zwischen beweglichen und/oder eingerollten Larven und

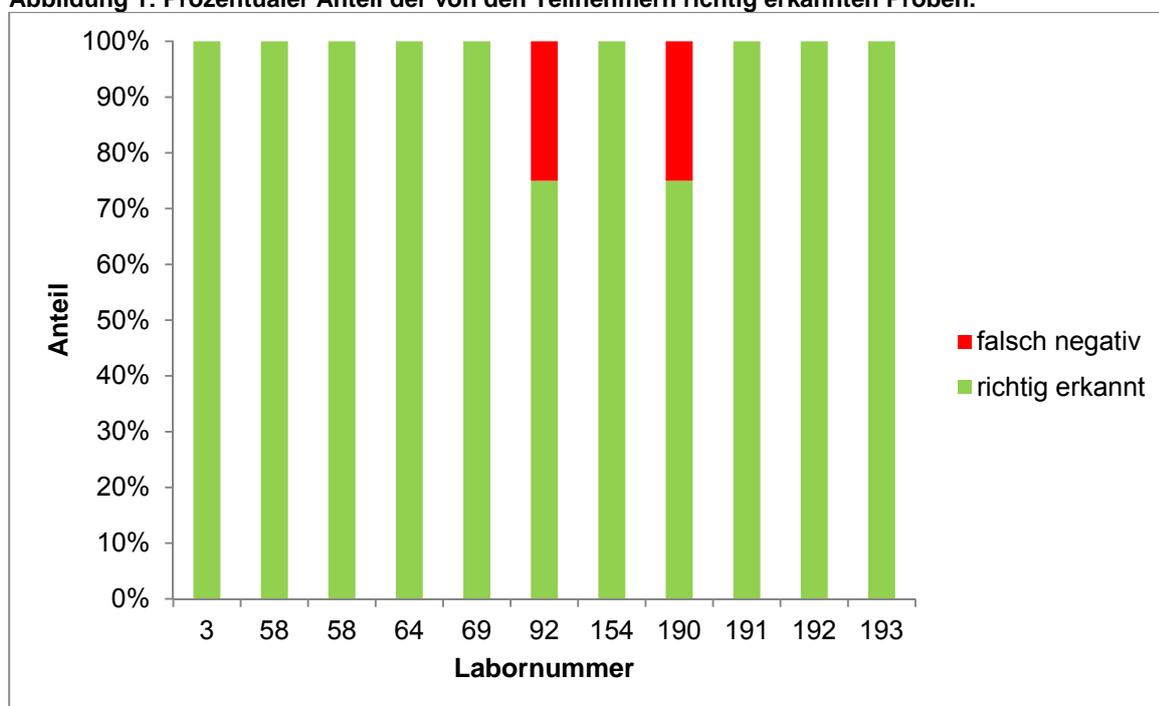
Larven, die in offener Form vorlagen und unbeweglich waren. Ein Labor machte nicht für alle gefundenen Larven Angaben. Insgesamt wurden 94 % der gefundenen Larven als lebend erkannt.

Von den zu bewertenden 33 *Trichinella*-positiven Proben wurden Larven in 31 Proben (94 %) gefunden. Insgesamt 2 Ergebnisse erwiesen sich als falsch-negativ. Von den 11 negativen Proben wurden alle korrekt als negativ beurteilt.

Bei den falsch-negativen Ergebnissen handelte es sich in beiden Fällen um die Probe 2 (Sollwert 3 L).

Nach Auswertung der Einzelergebnisse haben 9 Labore (82 %) alle Proben korrekt als *Trichinella*-positiv bzw. -negativ erkannt, siehe Abbildung 1. Von 2 Laboren wurde jeweils eine Probe falsch-negativ beurteilt.

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der von den Teilnehmern richtig erkannten Proben.



Die Übersicht der Ergebnisse aller Labore ist in der Tabelle 3, geordnet nach der laufenden Probennummer, dargestellt.

Tabelle 3: Ergebnisse der 11 Labore zur Anzahl der Larven in den Proben 1-4.

Probe	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Anzahl Proben		
					richtig er- kannt	falsch negativ	falsch positiv
<b>Sollwert</b>	<b>16</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>7</b>			
<b>Labor-Nr.</b>							
3	7	3	0	5	4		
58	10	3	0	5	4		
58	12	3	0	6	4		
64	10	3	0	5	4		
69	17	3	0	5	4		
92	17	0	0	1	3	1	
154	13	2	0	7	4		
190	14	0	0	6	3	1	
191	10	2	0	4	4		
192	3	16	0	6	4		
193	12	3	0	6	4		
<b>Mittelwert</b>	11,4	3,5	0,00	5,1			
<b>Standardabw.</b>	4,1	4,3	0,00	1,6			
<b>Toleranzbereich</b>	13-19	1-4	0	5-9			

Zeichenerklärung: rot = falsch-negative Ergebnisse; orange und fett gedruckt= Larvenzahl liegt im Warnbereich; gelb = Larvenzahl liegt im grenzwertigen Bereich; blau = mehr Larven gezählt als Sollwert.

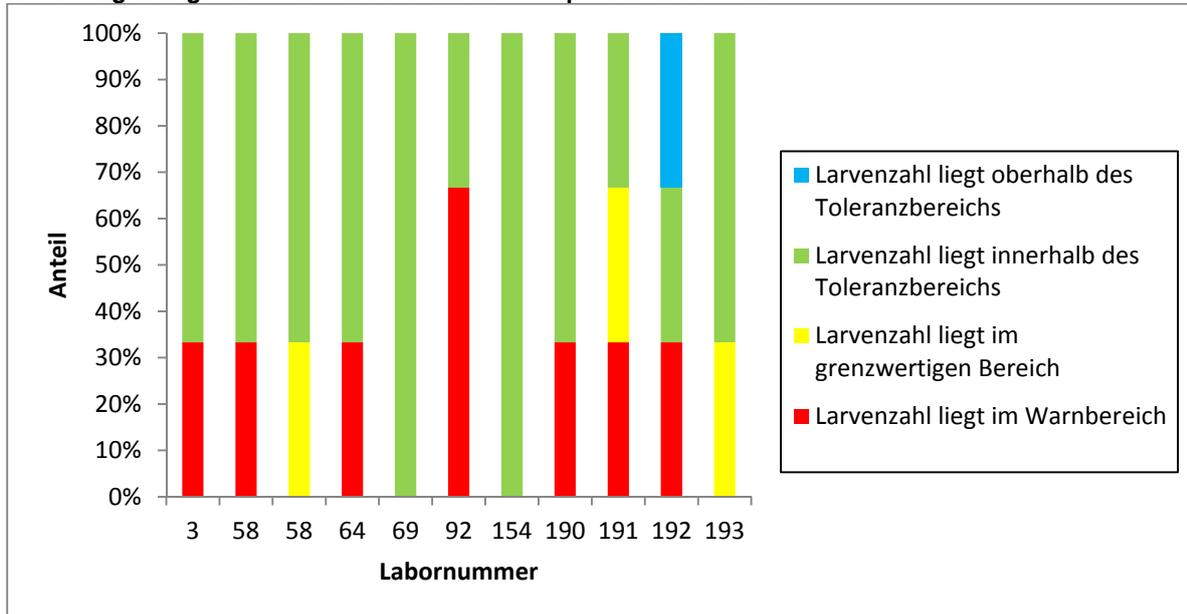
### 3.2 Quantitative Auswertung

Für die positiven Proben 1 und 4 lag der Mittelwert der Labore für die Larvenanzahl unter dem Sollwert. Bei Probe 2 lag der Mittelwert über dem Sollwert; die Standardabweichung war bei dieser Probe am höchsten (Tabelle 3).

Von den insgesamt 31 richtig erkannten und quantitativ ausgewerteten *Trichinella*-positiven Proben lag die ermittelte Larvenanzahl in 21 Fällen (67,7 %) im berechneten Toleranzbereich (grüner Bereich des z-score). Für 3 Proben (9,7 %) lagen die Ergebnisse im grenzwertigen Bereich (gelber Bereich des z-score) und 7 Proben (22,6 %) lagen außerhalb des Toleranzbereiches (Warnbereich).

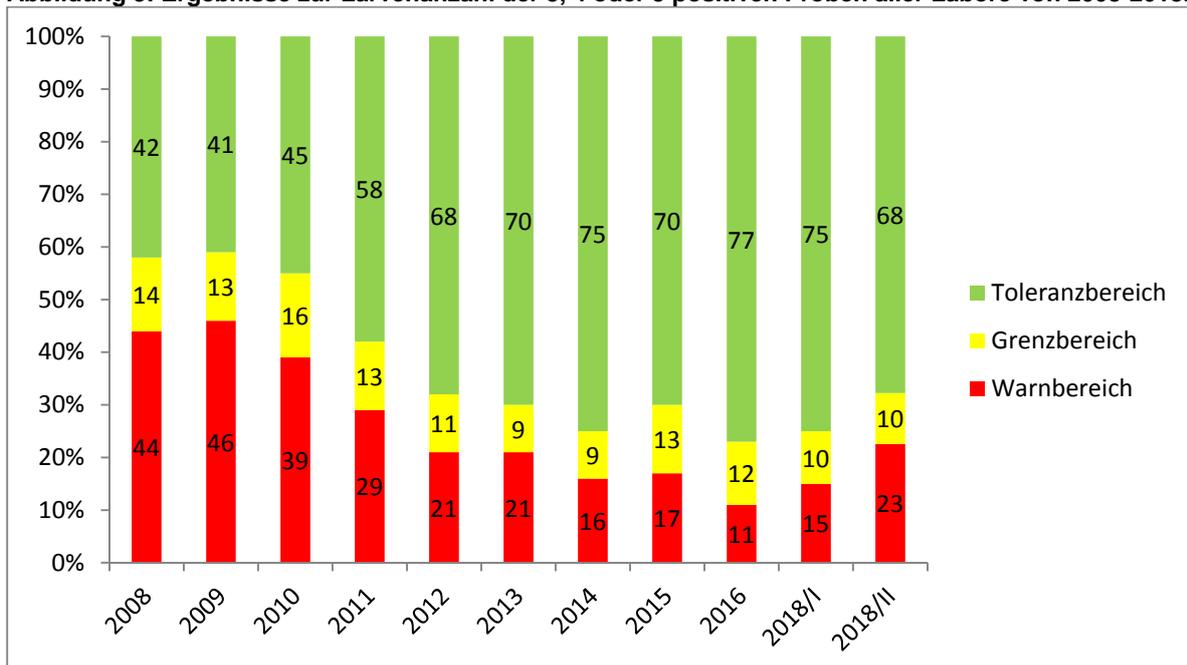
Nach den Ergebnissen der quantitativen Auswertung für die einzelnen Labore hatten 2 Teilnehmer (18 %) die ermittelte Larvenanzahl für alle drei positiven Proben gleichzeitig als qualitativ richtig bewertet und die ermittelte Larvenanzahl lag innerhalb des Toleranzbereichs und somit ausschließlich im grünen Bereich. Bei weiteren 2 Laboren (18 %) lag die ermittelte Anzahl der Larven der drei richtig bewerteten positiven Proben sowohl im grünen als auch im grenzwertigen (gelben) Bereich. Bei insgesamt 7 Laboren (64 %) befand sich die ermittelte Larvenanzahl bei mindestens einer Probe außerhalb des Toleranzbereichs und/oder mindestens eine Probe wurde falsch-negativ beurteilt. (Abbildung 2).

Abbildung 2: Ergebnisse zur Larvenanzahl der 3 positiven Proben.



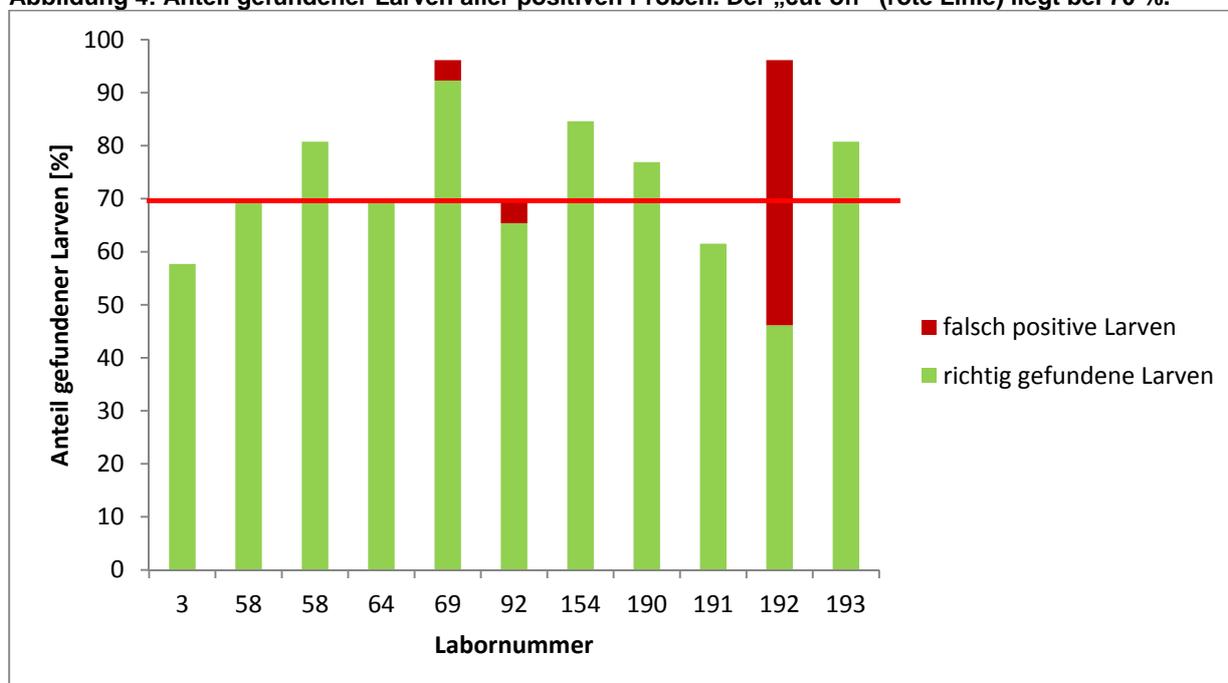
Beim Vergleich der quantitativen Auswertung der *Trichinella*-positiven Proben der vergangenen Jahre wird ersichtlich, dass die Anzahl der richtig erkannten Trichinellen mit 68 % im Toleranzbereich im Vergleich zu 2016 (77 %) abgesunken ist; die Zahl der im Warnbereich liegenden Proben dagegen ist wieder angestiegen. Allerdings sind diese Zahlen nicht direkt mit den LVUs aus den Vorjahren und der LVU 2018/I vergleichbar, da die Teilnehmerzahl bei der LVU 2018/II (11 Labore) deutlich geringer war. Bei der LVU 2018/I, bei der die Ergebnisse von insgesamt 108 Laboren ausgewertet wurden, lagen 75 % der richtig erkannten positiven Proben bezüglich der Larvenanzahl im Toleranzbereich (Abbildung 3).

Abbildung 3: Ergebnisse zur Larvenanzahl der 3, 4 oder 5 positiven Proben aller Labore von 2008-2018.



Nach einem allgemeinen Richtwert sollten mindestens 70 % aller Larven (von insgesamt 26) identifiziert werden. Von den 11 Teilnehmern konnten 9 Labore (82 %) mindestens 70 % der Larven ( $\geq 19$  Larven) identifizieren (Abbildungen 4).

Abbildung 4: Anteil gefundener Larven aller positiven Proben. Der „cut-off“ (rote Linie) liegt bei 70 %.



#### 4 Diskussion

Laborvergleichsuntersuchungen stellen nach wie vor einen wichtigen Bestandteil im Qualitätssicherungssystem dar. Durch die Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen können sowohl die eigene Untersuchungsqualität überprüft als auch Probleme bei der Trichinenuntersuchung erkannt und entsprechende Maßnahmen ergriffen werden. Die Befreiung von der Akkreditierungspflicht gemäß EU-Kontroll-Verordnung (EU) 2017/625 unterstreicht zudem die Bedeutung der LVU.

Die Ergebnisse der LVU 2018/II zeigen, dass auch in diesem Jahr die überwiegende Mehrheit der Teilnehmer den Anforderungen an die richtige qualitative Beurteilung der Proben gerecht wurde.

Von 82 % der Labore wurden alle Proben korrekt als *Trichinella*-positiv bzw. -negativ beurteilt. Insgesamt 6 Teilnehmer konnten mindestens 70 % der in den positiven Proben vorhandenen Larven detektieren, wobei ein Teilnehmer eine positive Probe mit einer hohen falsch positiven Larvenanzahl übermittelte. Dieser hohe falsch positive Anteil gefundener Larven ist höchstwahrscheinlich auf eine Probenverwechslung zurückzuführen.

Es sollte auch wieder die Vollständigkeit des Verdauungsvorgangs beurteilt werden. Nach der Verordnung (EU) 2015/1375 gilt der Verdauungsvorgang als zufriedenstellend, wenn nicht mehr als 5 % des ursprünglichen Gewichts der Probe auf dem Sieb bleiben. Bei einem Labor war bei einer von insgesamt vier Proben das Gewicht des Rückstandes auf dem Sieb größer als 5 g.

Ein größerer Rückstand auf dem Sieb könnte auf folgende Ursachen zurückzuführen sein:

- im zugefügten Probenmaterial befand sich unverdauliches Gewebe wie Bindegewebe oder Sehnen,
- Teile der Muskulatur wurden unzureichend verdaut.

Wenn zu viel Rückstand auf dem Sieb verbleibt, kann es zum Verlust von Larven kommen. Daher sollte während der Routineuntersuchungen im Fall der Überschreitung der Rückstandsmenge auf dem Sieb (> 5 g) der Ansatz wiederholt werden.

Bezugnehmend auf die quantitative Auswertung wird festgestellt, dass sich die Anzahl der im Toleranzbereich liegenden Proben im Vergleich zu den letzten Laborvergleichsuntersuchungen prozentual verringert hat. Allerdings ist dieser Vergleich aufgrund der geringen Teilnehmeranzahl fehlerbehaftet, da bei den anderen LVU jeweils mehr als 100 Labore teilgenommen haben. Rückblickend auf die letzten 5 Jahre kann jedoch konstatiert werden, dass die Anzahl der Proben im grünen Bereich durchschnittlich bei 72 % liegt und die Anzahl der im Warnbereich (roter Bereich) liegenden Proben im Durchschnitt mit 17 % verzeichnet werden kann.

Im Hinblick auf die gefundene Larvenanzahl bei den einzelnen Proben fällt auf, dass bei Probe 1, die mit der höchsten Larvenzahl gespikt war (16 Larven), deutlich mehr Proben im grenzwertigen Bereich oder im Warnbereich lagen als bei den Proben 2 und 4 mit dem Sollwert von 3 bzw. 7 Larven. So lagen bei Probe 1 die übermittelten Werte von 5 Laboren im roten Bereich während bei Probe 2 insgesamt 3 Labore und bei Probe 4 lediglich 1 Labor eine im roten Bereich liegende Larvenanzahl übermittelten.

Die falsch-negativen und -positiven Ergebnisse verdeutlichen, dass es weiterhin zu fehlerhaften Beurteilungen im Rahmen der Trichinenuntersuchung kommt. Im Fall einer falschen qualitativen Beurteilung von LVU-Proben ist die zuständige Behörde durch das betroffene Labor zu informieren und Korrekturmaßnahmen sind einzuleiten. In diesem Zusammenhang muss eine Fehleranalyse erfolgen, um nach Erkennung der Schwachstellen und durchgeführter Korrektur die Sensitivität und Spezifität der Nachweismethode zu verbessern. Bislang wurden den teilnehmenden Laboren die Ergebnisse ohne weitere Wertung übermittelt. In Zukunft (ab Januar 2020) wird jedoch ein qualitativ falsches Ergebnis zur Beurteilung „nicht bestanden“ führen.

Beim Auftreten von abweichenden Ergebnissen sollten im Rahmen der Fehleranalyse folgende Ursachen 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), sodass unverdautes Restmaterial auf dem Sieb zurückgeblieben ist.
- Die vorgeschriebene Zeit, die für die Sedimentation der Larven im Scheidetrichter erforderlich ist (30 min), wurde nicht eingehalten.
- Die vorgeschriebene Sedimentationszeit im 50 ml-Zentrifugenglas (10 min) war zu kurz.
- Es wurde zu wenig Sediment abgelassen.

- Es wurde zu viel Überstand aus dem Zentrifugenröhrchen abgesaugt, sodass Larven verloren gingen.
- 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, sodass Larven übersehen wurden.
- Die Kenntnisse zum Aussehen des Untersuchungsgegenstandes, d. h. zur Form und Größe der *Trichinella*-Larven, sind mangelhaft.
- Verwendung nicht geeigneter Gerätschaften, z. B. verstopfte Siebe, Sedimentationsbecken mit Rillen, Scheidetrichter/Hahnküken aus Plastik.

Eine Ursache für eine zu hohe Larvenzahl 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. Weiterhin kommt als Grund für falsch-positive Ergebnisse z. B. auch eine unzureichende Reinigung der vorher mit Trichinenlarven behafteten Gerätschaften in Frage.

Ferner sollte in regelmäßigen Abständen das für die Untersuchung verwendete Mikroskop bzw. Trichinoskop auf die richtige Justierung, zum Zweck der sicheren Nachweisbarkeit der Larven im Sediment, überprüft werden.

Als zusätzliche Hilfestellung kann unter folgendem Link der ordnungsgemäße Ablauf der Trichinenuntersuchung in Form einer Videopräsentation abgerufen werden:

<http://www.jove.com/video/55354>