

Laborvergleichsuntersuchung zum Nachweis von Trichinellen in Fleisch (2021/22)

Bericht des Nationalen Referenzlabors (NRL) für *Trichinella*

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)
Abteilung Biologische Sicherheit
FG Diagnostik, Erregercharakterisierung und Parasiten in Lebensmitteln
Max-Dohrn-Str. 8-10
10589 Berlin

1. Einleitung	2
2. Material und Methoden	3
2.1 Versuchstiere und Muskelproben	3
2.2 Material für die Laborvergleichsuntersuchung	3
2.3 Probenversand.....	4
2.4 Untersuchung der LVU Proben	4
2.5 Erfassung der Ergebnisse	4
2.6 Auswertung der Ergebnisse	4
2.7 Wiederholung der LVU.....	5
3. Ergebnisse	5
3.1 Teilnehmer*innen und verwendete Methoden.....	5
3.2 Qualität der Verdauungsvorgangs	5
3.3 Qualitative Auswertung	6
3.4 Wiederfindungsrate	6
3.5 Auswertung der Temperaturlogger	6
4. Diskussion	7

1. Einleitung

Die Trichinellose ist eine lebensmittelbedingte Zoonose, die durch Parasiten der Gattung *Trichinella* hervorgerufen wird. Ursache der Erkrankung ist der Verzehr von Fleisch infizierter Tiere, das entweder nicht bzw. nicht ordnungsgemäß auf Trichinellen untersucht wurde oder einem unzureichenden Inaktivierungsverfahren unterzogen wurde.

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.

Mit der neuen EU-Kontroll-Verordnung (EU) 2017/625 wird bei Erfüllung bestimmter Anforderungen die Akkreditierungspflicht für Trichinenuntersuchungsstellen (TUS) aufgehoben. Gemäß Art. 40, 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 (NRL) ausgerichtet werden, teilnehmen. Dies hatte grundlegende Änderungen im Hinblick

auf die Organisation und Koordinierung der LVU durch das NRL für *Trichinella* zur Folge, da mit einer sehr hohen Teilnehmerzahl (> 650 TUS) gerechnet werden musste.

Die neue Organisationsstruktur wurde 2020 eingeführt und sieht vor, dass die obersten Landesbehörden eine oder mehrere Koordinator*innen (KO) benennen, die als direkte Ansprechpartner*innen für das NRL für *Trichinella* fungieren und die LVU- Teilnahme der einzelnen TUS entsprechend koordinieren.

Pro Jahr bietet das NRL ca. 350 TUS die Teilnahme an einer LVU an, es werden ca. 17 LVU Durchgänge à 30 Teilnehmern organisiert. Dies bedeutet, dass alle in Deutschland gemeldeten TUS in einem Zweijahresturnus an einer LVU, die vom NRL organisiert wird, teilnehmen müssen.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Muskelproben

Zur Gewinnung des trichinösen Fleisches wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuches zwei Hausschweine mit ca. 40.000 *Trichinella spiralis* Muskellarven (Referenzstamm ISS 003) infiziert. Ca. 16 Wochen nach der Infektion wurden die Hausschweine betäubt und entblutet. Nach der Probenentnahme zur Bestimmung der LPG wurden die zerlegten Muskelpartien vakuumiert und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2 Material für die Laborvergleichsuntersuchung

Zur Herstellung der *Trichinella*-positiven Proben wurden für jeden Durchgang *T. spiralis* Larven mittels Digestion aus dem Muskelfleisch der infizierten Hausschweine gewonnen. Negatives Fleisch wurde mit einer Moulinette zerkleinert und in 20 g große Klopse geformt. Eine genau abgezählte Anzahl Larven wurde in die Klopse verbracht. Die Anzahl der Larven wurde in einem Sechsaugenprinzip verifiziert.

Es wurden pro TUS insgesamt vier Proben vorbereitet. Bei diesen Proben handelte es sich um eine *Trichinella*-negative und drei *Trichinella*-positive Proben.

Die positiven Proben setzten sich aus je einer Probe folgender Kategorien zusammen:

- geringe Anzahl: 3-4 Larven
- mittlere Anzahl: 5-10 Larven
- höhere Anzahl: 11-19 Larven

Die Proben wurden vor dem Versand eingeschweißt, entsprechend nummeriert und bis zum Versand bei 4 °C gelagert.

2.3. Probenversand

Am Ende des Vorjahres wurden den KO und den obersten Landesbehörden per Email eine Übersicht bezüglich der LVU-Jahresplanung für das kommende Jahr zugesandt. Ferner wurden die jeweiligen KO 12 Wochen vor dem Versand der Proben zusätzlich informiert.

Die Proben wurden in der entsprechenden LVU Woche jeweils am Montag direkt an die angemeldeten TUS per Express versandt. Beigefügt waren jeweils das Probenbegleitschreiben, der Ergebnisbogen und Informationen bzgl. der Rücksendung des Verpackungsmaterials und Temperaturloggers. Die KO wurden parallel per Email über den Probenversand informiert und erhielten zusätzlich eine Blanco-Ergebnistabelle sowie das entsprechende Probenbegleitschreiben.

2.4. Untersuchung der LVU Proben

Die Proben sollten mit einer nach VO (EU) 2015/1375 (aktuelle Fassung) vorgeschriebenen Methode der künstlichen Verdauung untersucht werden.

2.5. Erfassung der Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse und weitere Informationen über den Zustand der Proben mussten von den TUS spätestens am Freitag der Folgewoche in die Ergebnisbögen eingetragen und an die zuständigen KO übermittelt werden. Die Eintragung der Ergebnisse in die Blanco-Ergebnistabellen erfolgte durch die KO und sollte spätestens bis Freitag der Folgewoche zur Auswertung an das NRL geschickt werden.

2.6. Auswertung der Ergebnisse

In Anlehnung an die ISO 18743:2015, bei der die Auswertung des Untersuchungsergebnisses auf qualitativer Ebene vorgegeben ist, erfolgte die Auswertung der LVU für jeden Teilnehmer im Hinblick auf die Anzahl der falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnisse. Zertifikate über das Bestehen und Nichtbestehen der einzelnen TUS wurden per Email an die jeweiligen KO gesandt, welche/r diese wiederum an die entsprechende TUS weitergeleiten sollte.

Folgende Umstände hatten ein Nichtbestehen der LVU zur Folge:

- die Anmeldung erfolgt nicht/ erfolgt nicht termingerecht
 - die Übertragung der Ergebnisse an das NRL erfolgt nicht termingerecht
 - falsch positive oder falsch negative Ergebnisse
 - nicht untersuchte Proben.
-

2.7. Wiederholung der LVU

Für TUS, die das Ergebnis „nicht bestanden“ erzielt hatten, wurde eine Wiederholung der LVU angeboten. Probenversand, Rückmeldung und Ergebnisübermittlung erfolgten in gleicher Weise wie bei der Teilnahme an einer regulären LVU.

3. Ergebnisse

3.1. Teilnehmer*innen und verwendete Methoden

Insgesamt nahmen in 2020/21 646 TUS an der LVU in 29 Durchgängen (inkl. 6 Wiederholerwochen) teil. Letztendlich wurden mit allen Wiederholer*innen 755 Probensätze in diesem 2-jährigen LVU-Turnus versandt.

Alle Ergebnisse wurden termingerecht an das NRL übersandt, alle Proben wurden bearbeitet. Die große Mehrzahl der TUS (96%) untersuchten die Proben mittels Referenzmethode, andere Methoden wurden selten genutzt. Bei 63% der TUS erfolgte die Auswertung der Proben mit einem Stereomikroskop, 36% der TUS benutzten ein Trichinoskop und 1% der TUS machten keine Angaben.

3.2. Qualität der Verdauungsvorgangs

Um die Vollständigkeit des Verdauungsvorgangs zu beurteilen, sollte die Menge des unverdauten Restmaterials auf dem Sieb bestimmt werden. Der Verdauungsvorgang gilt als zufriedenstellend, wenn nicht mehr 5% des ursprünglichen Gewichts der Probe auf dem Sieb bleiben. Insgesamt lagen 85,9% der TUS bei den untersuchten LVU Proben innerhalb der erlaubten Restmenge (Details siehe Abbildung 1).

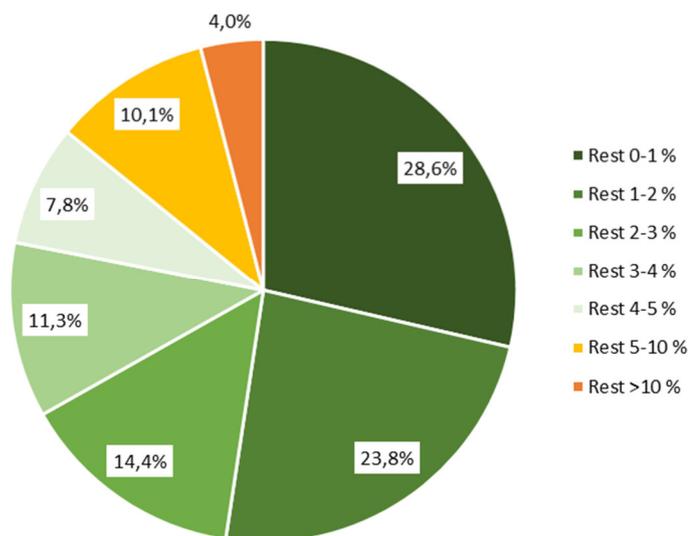


Abbildung 1: Verteilung der gefundenen Restmengen nach Verdau

3.3. Qualitative Auswertung

Nach Auswertung der Einzelergebnisse haben 84% der Teilnehmenden alle Proben korrekt als *Trichinella*-positiv bzw. -negativ erkannt und somit die LVU im ersten Durchgang bestanden. Von den TUS, die letztendlich die LVU wiederholten, haben 18% die LVU ein zweites Mal nicht bestanden.

In Tabelle 1 ist der Anteil richtig erkannter Proben in Abhängigkeit der Anzahl zu findender Larven dargestellt. LVU-Proben aus der Gruppe 2 (3-4 Larven) wurden mit 89,8% qualitativ richtiger Ergebnisse von allen vier Gruppen am häufigsten falsch erkannt.

Tabelle 1: Anteil richtig erkannter Proben in Abhängigkeit der Anzahl zu findender Larven

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
negativ	3-4 Larven	5-10 Larven	>= 10 Larven
96,0%	89,8%	95,4%	96,7%

3.4. Wiederfindungsrate

Nach einem allgemeinen Richtwert sollten mindestens 70 % aller Larven gefunden werden. In der LVU 2020/21 konnten von 58% aller Teilnehmenden mindestens 70% der Larven identifiziert werden.

3.5. Auswertung der Temperaturlogger

Die Auswertung der mitgeschickten Datenlogger ist in Abbildung 2 dargestellt. Die mittlere Transportdauer betrug 1,26 Tage mit einer Spannweite von 1,0 bis 3,39 Tagen. Die lange Transportzeit in KW 45/2021 (Wiederholungs-LVU) kann als Ausreißer betrachtet werden, da es in dieser Woche aufgrund betriebsinterner Probleme bei dem Transportunternehmen zu massiven Lieferverzögerungen kam. Als Kulanzregelung konnten alle TUS, die diese Wiederholungs-LVU erneut nicht bestanden hatten, die LVU in KW 04 des Jahres 2022 wiederholen.

Die mittlere Temperatur während der gesamten Transportzeit betrug 6,5 °C mit einer Spannweite von 2,4 bis 13,3°C. In einzelnen Paketen konnte ein kurzfristiger maximaler Temperaturwert von bis zu 25,6°C nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen Transportdauer/-temperatur und erfolgreicher Teilnahme konnte nicht festgestellt werden.

	Mittlere Temperatur bei Abholung	Mittlere Temp. der Proben während des Transports	Mittlere Transportzeit	Temperaturanstieg in der Box bis zur Ankunft	Max. Temp. in Probenbox während Transports	Rücksendung (Tage)	Durchfaller (Quote)
KW25/20	1,3°C	13,3°C	1,19 Tage	15,6°C	24,9°C	10,22 Tage	18%
KW27/20	-0,5°C	8,3°C	1,24 Tage	10,6°C	27,3°C	8,84 Tage	25%
KW28/20	-0,8°C	5,9°C	1,25 Tage	8,6°C	14,9°C	9,34 Tage	13%
KW38/20	-1,5°C	6,3°C	1,19 Tage	9,4°C	22,7°C	9,89 Tage	7%
KW40/20	-2,0°C	4,4°C	1,00 Tage	7,3°C	10,6°C	9,62 Tage	21%
KW42/20	-0,5°C	3,1°C	1,00 Tage	4,4°C	8,5°C	9,88 Tage	6%
KW44/20	0,7°C	6,2°C	1,05 Tage	7,0°C	13,3°C	11,05 Tage	32%
KW46/20	1,5°C	5,6°C	1,04 Tage	6,3°C	24,3°C	10,67 Tage	7%
KW48/20	1,6°C	5,5°C	1,05 Tage	4,1°C	14,3°C	7,76 Tage	13%
KW04/21	1,1°C	4,0°C	1,13 Tage	2,9°C	15,0°C	11,03 Tage	37%
KW06/21	3,5°C	2,8°C	1,08 Tage	2,6°C	15,7°C	10,03 Tage	0%
KW08/21	1,7°C	6,2°C	1,15 Tage	3,9°C	13,8°C	9,62 Tage	15%
KW10/21	0,5°C	4,3°C	1,12 Tage	5,0°C	19,1°C	9,54 Tage	19%
KW12/21	1,7°C	5,8°C	1,00 Tage	4,8°C	13,0°C	11,46 Tage	14%
KW17/21	3,7°C	7,3°C	1,21 Tage	4,1°C	16,4°C	10,21 Tage	11%
KW22/21	7,4°C	7,3°C	1,10 Tage	1,9°C	18,2°C	9,97 Tage	22%
KW24/21	5,6°C	9,2°C	1,48 Tage	7,1°C	25,6°C	10,39 Tage	13%
KW26/21	2,8°C	9,3°C	1,00 Tage	11,7°C	20,4°C	10,48 Tage	7%
KW35/21	1,1°C	9,1°C	1,04 Tage	11,6°C	18,2°C	8,60 Tage	28%
KW37/21	1,3°C	8,8°C	1,26 Tage	10,4°C	21,9°C	11,91 Tage	23%
KW39/21	1,1°C	9,2°C	1,44 Tage	9,1°C	19,3°C	10,15 Tage	18%
KW45/21	0,1°C	4,2°C	3,39 Tage	6,5°C	11,8°C	12,07 Tage	30%
KW47/21	-2,5°C	2,4°C	1,52 Tage	7,2°C	13,0°C	11,44 Tage	12%
Mittelwert	1,3°C	6,5°C	1,26 Tage	7,0°C	17,5°C	10,18 Tage	17,0%

Abbildung 2: Auswertung der Daten der mitgesandten Datenlogger

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.

Beim Auftreten von abweichenden Ergebnissen sollten im Rahmen der Fehleranalyse folgende Ursachen in Betracht gezogen werden:

- Unzureichendes Spülen der genutzten Gerätschaften (z. B. Moulinette, Becherglas, Trichter, Sieb)

- Die künstliche Verdauung der Proben verlief nicht optimal (z. B. falsche Konzentration von Salzsäure und Pepsin, überlagertes Pepsin, Pepsin minderer Qualität, Unterschreitung der vorgeschriebenen Verdauungszeit, Nichteinhaltung der Temperatur), sodass zu viel 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, falsche Justierung bei Mikroskopen.
- Unzureichende Reinigung der vorher mit Trichinenlarven behafteten Gerätschaften.

Bei Nichtbestehen der LVU bietet das NRL länderübergreifend Wiederholungswochen an. Die entsprechende TUS muss die Wiederholung der LVU mit den jeweiligen Koordinator*innen abklären. Im Falle eines erneuten Nichtbestehens sollte das Labor an einer Schulung teilnehmen. Die Organisation und Durchführung dieser Schulung liegt in Verantwortung der Länder. Nach erfolgreicher Schulung kann die entsprechende TUS wieder zur LVU-Teilnahme angemeldet werden.

Zur Unterstützung der KO und der TUS bietet das NRL Schulungsmaterial in Form von Vorträgen, Fotos und einem Video an. Ferner können auch trichinöses Fleisch und nach Absprache mit Trichinellenlarven versetzte Fleischbällchen zur Verfügung gestellt werden.

Als Teil des Qualitätsmanagements des NRL *Trichinella* wurde den LVU Teilnehmer*innen auch die Möglichkeit gegeben, die LVU Organisation zu kommentieren. 26% der Teilnehmer*innen machten davon Gebrauch. Die häufigsten Anmerkungen konnten unter den Rubriken ‚Probenverpackung‘ (19%) und ‚Qualität der Proben‘ (8%) verzeichnet werden. Die Teilnehmer*innen wünschten sich eine Rückkehr der in den LVUs vorheriger Jahre verwendeten Probendöschen, da diese als hygienischer empfunden werden und sich besser ausspülen lassen. Aufgrund der großen Anzahl der TUS, die an der vom NRL organisierten

LVU teilnehmen, ist dies leider nicht mehr möglich. Es wird allerdings darauf hingewiesen, dass das Ausspülen der Plastikbeutel auf das Ergebnis der LVU-Untersuchung keine Auswirkung hat, da die Larven nicht aus den Fleischbällchen auswandern können.

Die häufigste Anmerkung zu der Qualität der Probe war, dass Sehnen, Fasern oder Fett in den Restmengen zu finden waren und dies auf das für die LVU verwandte Fleisch zurückgeführt wurde. Für die Herstellung der LVU-Proben wird Schinkengulasch oder Schweinelachs aus dem Handel verwendet. Jegliches sichtbare Fett- und Bindegewebe wird entfernt, und offensichtlich sehnige Stücke werden ausgesondert. Es kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass einzelne Fleischbällchen derartige Strukturen beinhalten.