

Ringversuch zum Nachweis von Trichinellen in Fleisch (2007)

Bericht des Nationalen Referenzlabors für *Trichinella*

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

Dr. Karsten Nöckler
Tel.: 030-8412 2053
Fax: 030-8412-2000
e-mail: karsten.noeckler@bfr.bund.de

Frau Sabine Reckinger
Tel.: 030-8412-2073
e-mail: sabine.reckinger@bfr.bund.de

Statistische Auswertung:
Herr Peter Bahn
Tel.: 030-8412-2058
e-mail: peter.bahn@bfr.bund.de

1 Einleitung

Nach Artikel 2 der Verordnung EG Nr. 2075/2005 der Europäischen Kommission vom 5. Dezember 2005 ist die Trichinenuntersuchung nach einer Methode der künstlichen Verdauung durchzuführen, wobei das Magnetrührverfahren als Referenzmethode gilt. In diesem Zusammenhang hat die zuständige Behörde nach Artikel 5 u.a. sicherzustellen, dass das Untersuchungspersonal eine entsprechende Ausbildung absolviert und an einem Qualitätskontrollprogramm für die Trichinennachweisverfahren teilnimmt. Deshalb bestand auch im Jahr 2007 ein großes Interesse am Ringversuch zum Nachweis von Trichinellen im Fleisch, was an der kontinuierlich wachsenden Zahl der Teilnehmer deutlich wird.

Die Auswertung der Ergebnisse des Ringversuches erfolgte in der bewährten Weise 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 im Referenzlabor ermittelten 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*-Muskellarven (Referenzstamm ISS 003 aus der Muskulatur eines infizierten Meerschweinchens) infiziert. Etwa 19 Wochen nach der Infektion wurde das Schwein mit einem Gewicht von ca. 150 kg 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 (Zwerchfellpfeiler, Zunge, Kaumuskulatur, Schulter, Vorderbein, Bauch, Zwischenrippe, Kotelett und Schinken) 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 645, Zunge 813, Kaumuskulatur 296, Schulter 194, Vorderbein 213, Bauch 165, Zwischenrippe 107, Kotelett 59 und Schinken 110 LpG.

Ringversuchsmaterial

Die Herstellung der *Trichinella*-positiven Proben erfolgte aus dem Schinken (110 LpG) des infizierten Schweins, der in einer Moulinette zerkleinert wurde. Anschließend wurden insgesamt 8, 14 und 40 g des zerkleinerten Schinkens mit negativem zerkleinerten Schweinefleisch in einem bestimmten Verhältnis vermischt, um in der Fleischmasse der drei Ansätze eine rechnerische Larvenbefallsrate von etwa 2, 4 bzw. 8 LpG zu erhalten.

Zur Ermittlung der tatsächlichen Larvenbefallsrate (Sollwert) wurden aus jedem Ansatz 10 Proben untersucht, indem jeweils 3 g der die *Trichinella*-Larven enthaltenden Fleischmasse mit 97 g des negativen Schweinefleisches nach der Methode der künstlichen Verdauung im Magnetrührverfahren untersucht wurden. Der Toleranzbereich ergab sich aus der Berechnung des Mittelwertes (Sollwert) plus bzw. minus der einfachen Standardabweichung (Tabelle 1). Alle nachfolgenden Angaben zur Larvenbefallsrate (LpG) beziehen sich auf die Annahme, dass die eine im Pool von 100 g untersuchte *Trichinella*-positive Probe mit einem Gewicht von 1 g eingesetzt wurde.

Tabelle 1: Ermittlung des Sollwertes für die Larvenbefallsrate (LpG) aus 10 Proben je Ansatz

Stück Nr.	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
1	6	9	33
2	3	4	25
3	7	17	27
4	6	5	12
5	5	8	23
6	6	9	27
7	2	33	45
8	2	12	46
9	4	24	35
10	4	7	15
Sollwert*	4,5	12,8	28,8
Standardabw. (s)	1,7	8,8	10,7
Sollwerttoleranz**	2-7	4-22	18-40

*aus dem Mittelwert der 10 Ansätze

**Toleranzbereich = Sollwert/Mittelwert \pm 1s, gerundet

Für den Ringversuch wurden pro Teilnehmer insgesamt 10 Proben vorbereitet. Bei diesen Proben handelte es sich um 6 *Trichinella*-positive (3 positive Doppelproben der Ansätze 1-3) und 4 negative Proben (Tabelle 2).

Tabelle 2: Status der Proben für den Ringversuch

Probe Nr.	Status	Sollwert* (LpG)	Sollwerttoleranz (LpG)
1	positiv	5	2-7
2	positiv	29	18-40
3	positiv	13	4-22
4	negativ	-	-
5	negativ	-	-
6	positiv	29	18-40
7	negativ	-	-
8	positiv	13	4-22
9	positiv	5	2-7
10	negativ	-	-

*gerundet

Von jeder Probe wurden 3 g der Muskulatur in einem Plastikbeutel vakuumverpackt und entsprechend nummeriert. Alle Proben wurden bis zum Versand im Kühlraum bei 4°C gelagert.

Ringversuchsteilnehmer

Insgesamt nahmen 40 Labors aus 15 Bundesländern (Bayern, Brandenburg, Berlin, Baden-Württemberg, Bremen, Hessen, Mecklenburg-Vorpommern, Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen, Rheinland-Pfalz, Sachsen, Sachsen-Anhalt, Saarland, Schleswig-Holstein und Thüringen) an dem Ringversuch teil. Dabei handelte es sich um 1 bis 5 Labore je Bundesland. Von vier Laboren wurden die Ergebnisse nicht im vorgegebenen Zeitraum übersandt.

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 der für die Trichinenuntersuchung beim Schwein vorgeschriebenen Methode der künstlichen Verdauung (Magnetrührverfahren, Trichomatic 35) zu untersuchen. Innerhalb von 3 Wochen nach dem Erhalt der

Proben, spätestens jedoch 4 Wochen nach dem Versand der Proben, mussten die Ergebnisse auf einem vorbereiteten Formblatt an das BfR zurückgesendet werden.

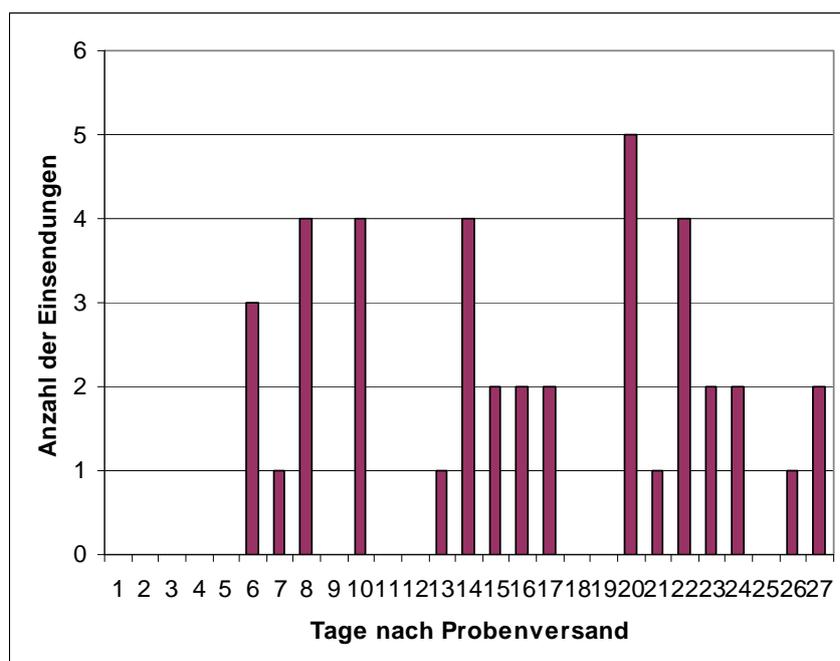
Auswertung der Ergebnisse

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). Mit Hilfe des T-Testes wurden die Ergebnisse auf die Vergleichbarkeit der *Trichinella*-positiven Doppelproben 1+9, 3+8 u. 2+6 geprüft (Test bei gepaarten Stichproben).

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der 40 Ringversuchsteilnehmer wurden zwischen dem 6. und 27. Tag nach dem Versand der Proben übersandt (Abbildung 1).

Abbildung 1: Zahl der Einsendungen der Teilnehmer am Tag nach dem Probenversand

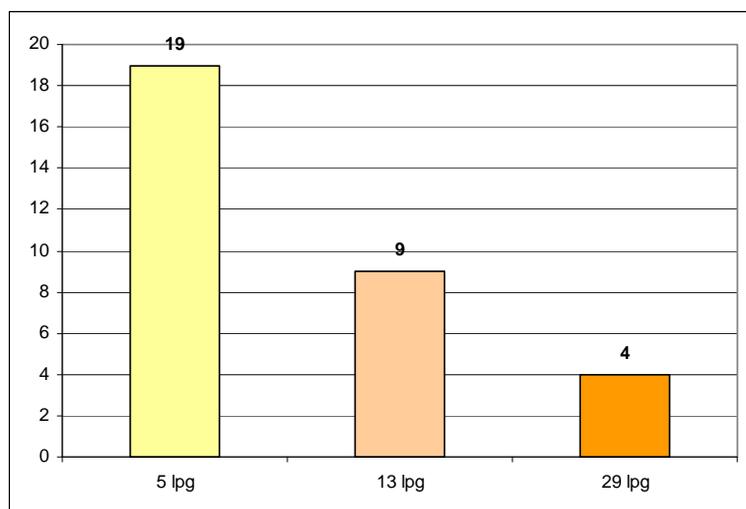


Qualitative Auswertung

Alle Teilnehmer führten das Magnetrührverfahren nach dem Prinzip der künstlichen Verdauung durch. Von den insgesamt versandten 240 *Trichinella*-positiven Proben wurden Larven in 208 Proben (87 %) gefunden. 32 Ergebnisse erwiesen sich als falsch-negativ (13 %). Von den 160 negativen Proben wurden 156 (98 %) korrekt und 4 als falsch-positiv (2 %) beurteilt.

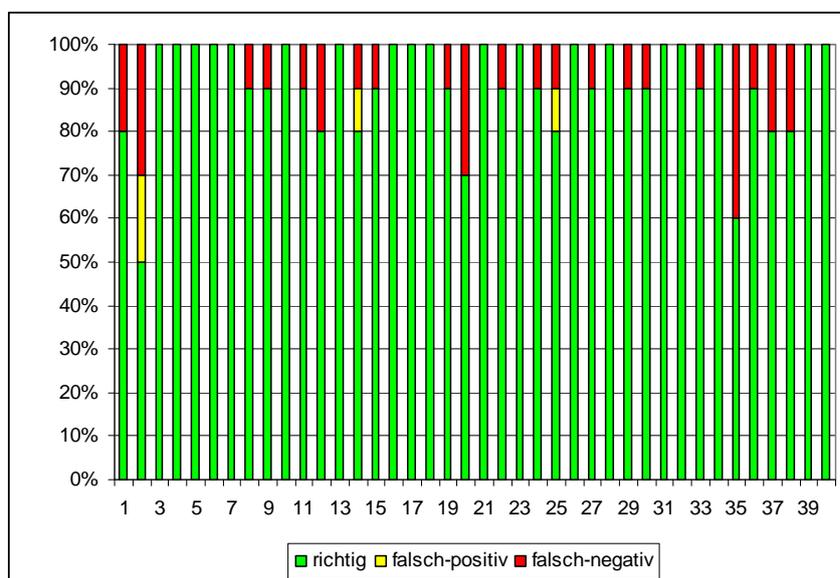
Bei den im Magnetrührverfahren ermittelten 32 falsch-negativen Ergebnissen handelte es sich in 19 Fällen um die Proben 1+9 (Sollwert 5 LpG), in 9 Fällen um die Proben 3+8 (Sollwert 13 LpG) und in 4 Fällen um die Proben 2+6 (Sollwert 29 LpG) (Abbildung 2).

Abbildung 2: Falsch-negative Ergebnisse für die Proben 1+9 (5 LpG), 3+8 (13 LpG) und 2+6 (29 LpG)



Nach Auswertung der Einzelergebnisse haben 19 Labore (48 %) alle 10 Proben korrekt als *Trichinella*-positiv bzw. -negativ erkannt (Abbildung 3). Von 12 Laboren wurde eine Probe, und von 4 Laboren 2 Proben als falsch-negativ beurteilt. Jeweils ein Labor hatte 3 bzw. 4 falsch-negative Ergebnisse. Zwei Labore beurteilten jeweils eine Probe als falsch-negativ bzw. falsch-positiv und ein weiteres hatte 3 falsch-negative und 2 falsch-positive Ergebnisse.

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



Die Übersicht für die Ergebnisse aller Labore ist in der Tabelle 3, geordnet nach der laufenden Nummer der Probe sowie der richtig erkannten und falsch-negativen Ergebnisse, dargestellt.

Tabelle 3: Ergebnisse der 40 Labore zur Anzahl der Larven in den Proben 1-10

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	richtig	falsch- pos.	falsch- neg.
Sollwert	5	29	13	0	0	29	0	13	5	0			
Labor	Dig	Dig	Dig	Dig	Dig	Dig	Dig	Dig	Dig	Dig			
1	0	7	6	0	0	8	0	1	0	0	8		2
2	5	8	0	0	15	0	1	6	0	0	5	2	3
3	3	17	3	0	0	22	0	5	3	0	10		
4	2	25	5	0	0	28	0	23	4	0	10		
5	2	25	26	0	0	18	0	15	1	0	10		
6	6	33	9	0	0	27	0	9	6	0	10		
7	1	21	9	0	0	23	0	4	1	0	10		
8	0	5	12	0	0	18	0	12	2	0	9		1
9	1	16	7	0	0	21	0	0	1	0	9		1
10	11	30	2	0	0	31	0	11	1	0	10		
11	2	41	0	0	0	26	0	4	4	0	9		1
12	2	7	2	0	0	8	0	0	0	0	8		2
13	1	10	3	0	0	8	0	3	1	0	10		
14	2	17	4	1	0	15	0	4	0	0	8	1	1
15	2	18	6	0	0	26	0	0	2	0	9		1
16	1	7	8	0	0	5	0	5	1	0	10		
17	1	38	8	0	0	52	0	33	21	0	10		
18	2	10	6	0	0	18	0	3	3	0	10		
19	3	0	1	0	0	10	0	1	3	0	9		1
20	0	9	3	0	0	12	0	0	0	0	7		3
21	3	25	1	0	0	66	0	5	3	0	10		
22	0	30	2	0	0	7	0	3	4	0	9		1
23	9	17	1	0	0	22	0	7	3	0	10		
24	0	15	1	0	0	16	0	2	5	0	9		1
25	1	41	1	0	11	0	0	3	5	0	8	1	1
26	4	6	14	0	0	35	0	9	2	0	10		
27	0	9	5	0	0	19	0	7	5	0	9		1
28	2	15	4	0	0	18	0	2	2	0	10		
29	0	15	21	0	0	14	0	3	3	0	9		1
30	0	13	3	0	0	4	0	1	1	0	9		1
31	2	13	7	0	0	10	0	2	3	0	10		
32	3	15	4	0	0	6	0	31	1	0	10		
33	2	11	3	0	0	9	0	5	0	0	9		1
34	3	23	8	0	0	27	0	8	3	0	10		
35	1	21	0	0	0	0	0	0	0	0	6		4
36	3	16	4	0	0	4	0	4	0	0	9		1
37	0	5	0	0	0	2	0	7	1	0	8		2
38	0	2	2	0	0	6	0	5	0	0	8		2
39	2	2	2	0	0	24	0	3	4	0	10		
40	3	43	7	0	0	28	0	4	3	0	10		
Mittelw.	2,1	17,0	5,3	0,0	0,7	17,3	0,0	6,3	2,6	0,0	364	4	32
St.abw.	2,3	11,1	5,4	0,2	2,9	13,5	0,2	7,4	3,4	0,0			
Tol.-bereich	2-7	18-40	4-22	0	0	18-40	0	4-22	2-7	0			

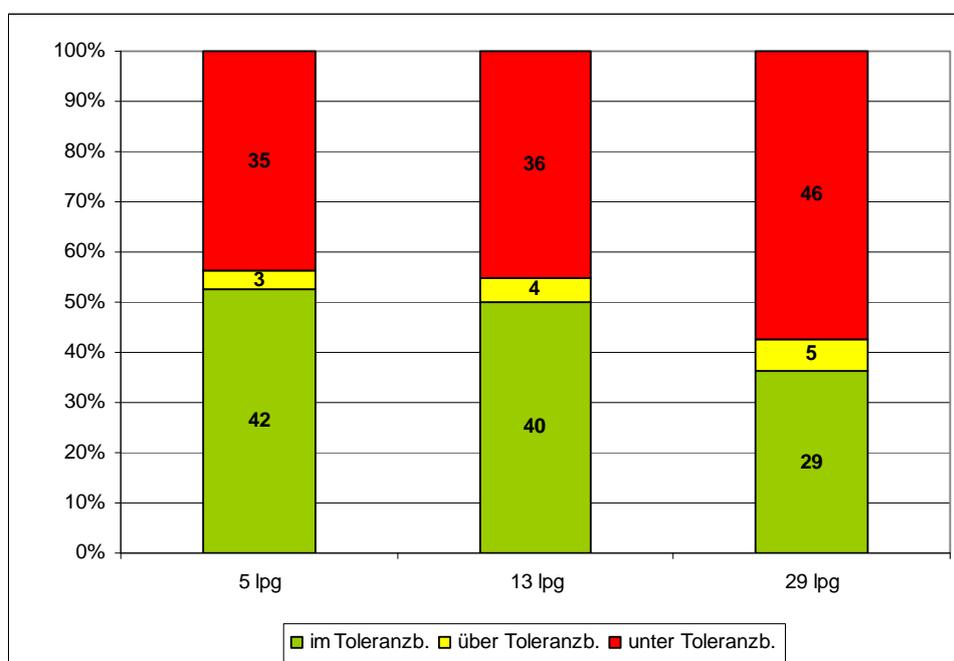
Zeichenerklärung: rot=falsch-negative oder falsch-positive Ergebnisse;
 grün=Larvenzahl liegt unterhalb des Toleranzbereiches;
 blau= Larvenzahl liegt oberhalb des Toleranzbereiches

Quantitative Auswertung

Für die jeweiligen positiven Proben lag der Mittelwert der Labore für die Larvenzahl unter dem Sollwert, wobei die Standardabweichung bei den Proben 2+6 (29 LpG) erwartungsgemäß am höchsten war (Tabelle 3).

Von den insgesamt 240 untersuchten *Trichinella*-positiven Proben lag die ermittelte Larvenzahl in 111 Fällen (46 %) im berechneten Toleranzbereich. Im Vergleich dazu lag die ermittelte Larvenzahl für 12 Proben (5 %) über und für 117 Proben (49 %) unter dem Toleranzbereich. Dabei war für die Proben 2+6 (29 LpG) der Anteil der Ergebnisse, für welche die Anzahl der ermittelten Larven außerhalb des Toleranzbereiches lag, am höchsten (Abbildung 4).

Abbildung 4: Anzahl der *Trichinella*-positiven Proben 1+9 (5 LpG), 3+8 (13 LpG) und 2+6 (29 LpG), für welche die Larvenzahl über alle Labore im Toleranzbereich, darüber oder darunter lag

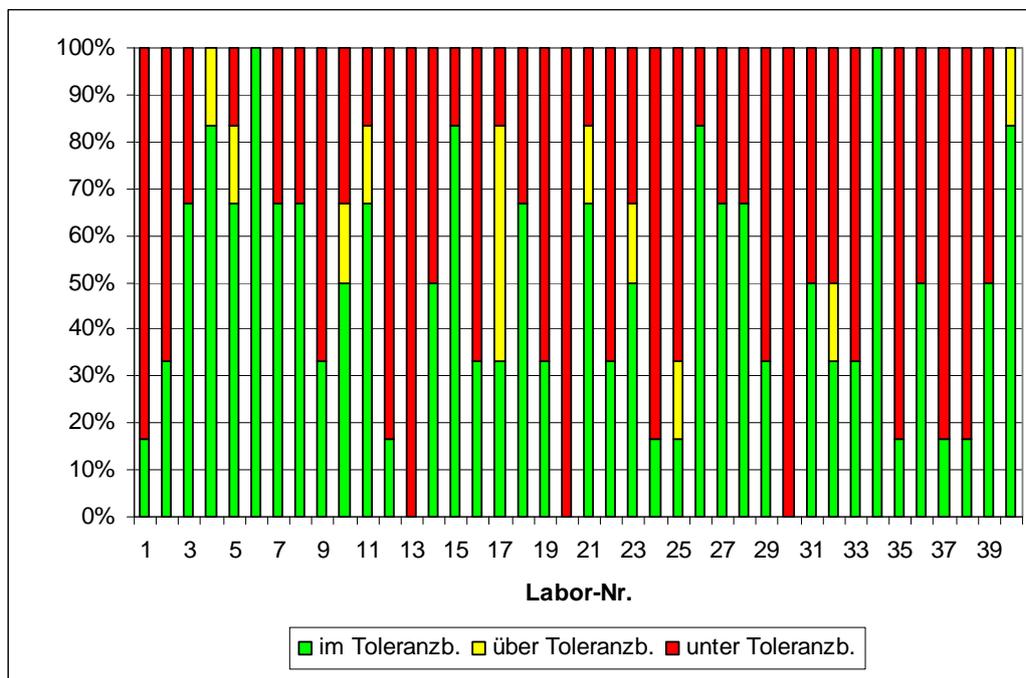


Nach den Ergebnissen der quantitativen Auswertung für die einzelnen Labore lag die ermittelte Larvenzahl für alle 6 *Trichinella*-positiven bei nur 2 Teilnehmern im ermittelten Toleranzbereich (Abbildung 5). Bei 15 Laboren (38 %) befand sich die ermittelte Larvenzahl bei mindestens 4 Proben im Toleranzbereich.

Im Gegensatz dazu war bei 17 Laboren (43 %) bei 4 oder mehr *Trichinella*-positiven Proben die Larvenzahl zu niedrig oder es handelte sich um falsch-negative Proben (Abbildung 5).

Von den 12 Proben, bei denen die Larvenzahl über dem Toleranzbereich lag, entfielen jeweils eine Probe auf 9 und 3 Proben auf ein Labor (Abbildung 5).

Abbildung 5: Ergebnisse zur Larvenzahl der 6 Proben für die einzelnen Labore



In der Tabelle 4 sind die Ergebnisse des T-Testes für gepaarte Stichproben dargestellt. Dabei wurde für T bei 39 Freiheitsgraden und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ein Grenzwert von $\pm 2,02$ ermittelt (ab diesem Wert sind die Unterschiede zwischen den Proben signifikant). Danach konnten signifikante Unterschiede für die Larvenzahl für die *Trichinella*-positiven Doppelprobe 1+9, 3+8 sowie 2+6 nicht festgestellt werden.

Tabelle 4: Ergebnisse des T-Testes für die Proben 1+9 (5 LpG), 3+8 (13 LpG) und 2+6 (29 LpG)

Probenpaar		Gepaarte Differenzen					T kritischer Wert $\pm 2,02$	df	Sig. (2-seitig)
		Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	95 % Konfidenzintervall der Differenz		T(0.05;39)		
					Untere	Obere			
Paare 1	Probe 1 Probe 9	-0,425	4,224	0,668	-1,776	0,926	-0,636	39	0,528
Paare 2	Probe 2 Probe 6	-0,300	13,801	2,182	-4,714	4,114	-0,137	39	0,891
Paare 3	Probe 3 Probe 8	-1,000	8,130	1,286	-3,600	1,600	-0,778	39	0,441

4 Diskussion

Die Zahl der am Ringversuch 2007 teilgenommenen 40 Labore stieg weiter an und verdeutlicht das Interesse zur Teilnahme an Qualitätskontrollen im Rahmen der Trichinenuntersuchung. Auch im Ringversuch 2007 verwendeten die Labore ausschließlich das Magnetrührverfahren.

Nach den Ergebnissen zur Bestimmung des Sollwertes für die 3 *Trichinella*-positiven Doppelproben war die Streuung für die Larvenzahl im Fleisch relativ groß (Tabelle 1). Aus diesem Grund wurde zur Bestimmung des Toleranzbereiches lediglich die einfache Standardabweichung vom Mittelwert (Sollwert) gewählt.

Im Vergleich zum Vorjahr fiel der Anteil der Labore, welche alle 10 Proben korrekt als *Trichinella*-positiv bzw. -negativ beurteilt haben, mit 48 % geringer aus (Abbildung 3). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Einstellung der Larvenzahl in den Proben noch anspruchsvoller war und den Untersuchern ein hohes Maß an Genauigkeit abverlangte. Dieses trifft insbesondere für die Proben 1+9 mit einer geringen Larvenzahl (Sollwert 5 LpG) zu, bei denen der Anteil der falsch-negativen Ergebnisse mit 59 % am höchsten war (Abbildung 2). In jedem Fall hätten jedoch die Proben 3+8 (13 LpG) sowie 2+6 als *Trichinella*-positiv erkannt werden müssen.

Beim Auftreten von falsch-negativen Ergebnissen oder zu wenig nachgewiesener Larven müssen u.a. folgende Ursachen in Betracht gezogen werden:

- 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.

Nach den Ergebnissen der quantitativen Auswertung lag die Anzahl der Larven für die 240 untersuchten *Trichinella*-positiven Proben bei vielen Laboren außerhalb des ermittelten Toleranzbereiches (Tabelle 3, Abbildung 5). Während knapp die Hälfte der Ergebnisse (46 %) zur Larvenzahl im ermittelten Toleranzbereich lag, entfiel die deutliche Mehrzahl der Ergebnisse außerhalb des Toleranzbereiches auf Proben in denen zu wenige Larven nachgewiesen worden sind (49 %). Auch hier sollte eine Fehleranalyse erfolgen, um die Sensitivität der Nachweismethode zu verbessern. Ursache für zu hohe Larvenzahlen (5 %) 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.