

Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

Untersuchungen zur Prävalenz des Duncker'schen Muskelegels in Wildtierpopulationen

Kurztitel: DME in Wildbret

Zuwendungsempfänger/

Ausführende Stellen: Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät
Institut für Lebensmittelhygiene
An den Tierkliniken 1
D-04301 Leipzig
Prof. Dr. Ernst Lücker, Projektleiter
Tel.: 0341-97-38222, Fax: -38249

Forschungsprojekt Nr.: 2808HS012
Laufzeit: 01.09.2008-31.08.2010
Berichtszeitraum 01.09.2008-31.07.2010

Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Name	Institution
Dr. Knut Große und DVM Tanja Wüste	Stadt Brandenburg an der Havel Gesundheits-, Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Klosterstraße 14 14770 Brandenburg an der Havel
DVM Petra Kabelitz	Landkreis Uckermark Gesundheits- und Veterinäramt Karl-Marx-Str. 1 17291 Prenzlau
Dr. Karsten Nöckler	Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Nationales Referenzlabor für <i>Trichinella</i> Diedersdorferweg 1 12277 Berlin
Prof. Dr. Edoardo Pozio	Istituto Superiore di Sanità International <i>Trichinella</i> Reference Centre 299 Viale Regina Elena 00161 - Rom Italien

Inhalt

1	Ziele und Aufgabenstellung des Projekts	8
1.1	Planung und Ablauf des Vorhabens	11
1.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	12
1.2.1	Einleitung	12
1.2.2	<i>Alaria alata</i> - Geschichte und Taxonomie	13
1.2.3	Wirtspektrum	13
1.2.4	Entwicklungszyklus.....	13
1.2.5	Morphologie der <i>A. alata</i> Mesozerkarie	15
1.2.6	Vorkommen.....	16
1.2.7	Pathogenität	16
1.2.8	Risikobewertung.....	18
2	Materialien und Methoden	19
2.1	Meilenstein „Methodik“	19
2.1.1	Materialien für die Durchführung des Referenzverfahrens zur künstlichen Verdauung von Sammelproben (<i>Trichinella</i> inspection method, TIM)	19
2.1.2	Probenahme und zu verarbeitende Mengen.....	20
2.1.3	Verfahren	20
2.1.4	Materialien für die Durchführung des Magnetrührverfahrens zur künstlichen Verdauung Fettgewebe (Lipid digestion method, LDM).....	22
2.1.5	Probenahme und zu verarbeitende Mengen.....	22
2.1.6	Verfahren	22
2.1.7	Materialien für die Durchführung des modifizierten Larvenauswanderverfahrens (<i>Alaria alata</i> mesocercariae migration technique, AMT)	23
2.1.8	Probenahme und zu verarbeitende Mengen.....	23
2.1.9	Verfahren	24
2.2	Meilenstein „Prädilektionsstellen“	25
2.2.1	Probenbeschaffung (bei Anfall DME-positiver Stücke).....	25
2.2.2	Probennahme.....	25
2.2.3	Untersuchung der Proben.....	26
2.3	Meilenstein „Prävalenz“	27
2.3.1	Prävalenz I und II	27
2.3.2	Erhebung mittels Fragebogen	27
2.4	Meilenstein Spezies/Tenazität	29

2.4.1	Herstellung von Rohwurst.....	29
2.4.2	Material und Herstellung im Rahmen des Versuchs	30
2.4.3	Einfrierversuche	30
2.4.4	Einfrierversuch mit Flomen vom Hausschwein:	30
2.4.5	Molekularbiologische Untersuchungen zur Feststellung eventueller Verwandschaftsunterschiede.....	31
2.4.6	Proben.....	31
2.4.7	Primerdesign	32
2.4.8	DNA Isolation aus einzelnen Larven.....	32
2.4.9	PCR Amplifikation der 18S rDNA Region	32
2.4.10	Genotypisierung mittels Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)-Reaktion	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse.....	35
3.1.1	Meilenstein „Methodik“	35
3.1.2	Meilenstein „Prädilektionsstellen“	43
3.1.3	Meilenstein „Prävalenz“	43
3.1.4	Meilenstein Tenazität/Spezies	43
3.2	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	43
4	Zusammenfassung	43
5	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	43
6	Literaturverzeichnis	43
7	Anhang	53
7.1	Möhl K., Große K., Hamedy A., Wüste T., Kabelitz P. und Lücker E. (2009) Biology of <i>Alaria</i> spp. and human exposition risk to <i>Alaria</i> mesocercariae -a review. Parasitol. Res. Parasitol Res. 105(1):1-15	
7.2	Riehn K., Hamedy A., Große K., Zeitler L. und Lücker E. (2010) A novel detection method for <i>Alaria alata</i> mesocercariae in meat. Parasitol. Res. 107(1):213-220	
7.3	Lücker E., Möhl K., Hamedy A., und Große K. (2009) Detection of <i>Alaria</i> spp. mesocercariae in game meat in Germany (Poster). International Conference on Hygiene of Game Meat, Brno, 18-19 June 2009	

- 7.4 Wüste T., Große K., Hamedy A., Möhl K. und Lücker E. (2009) Funde des Duncker'schen Muskelegels im Rahmen der amtlichen Trichinellenuntersuchung (Poster). 50. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene. Garmisch-Partenkirchen, 29.09.-02.10.2009
- 7.5 Kabelitz P., Franzke K., Hamedy A., Möhl K. und Lücker E (2009) Studien zur Prävalenz der Mesozerkarie von *Alaria alata* in Wildschweinen in der Uckermark (Poster). 50. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene. Garmisch-Partenkirchen, 29.09.-02.10.2009
- 7.6 Hamedy A, Möhl K, Große K und Lücker E (2009): Untersuchungen zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels in Wildschweinen (Poster). 50. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene. Garmisch-Partenkirchen, 29.09.-02.10.2009
- 7.7 Riehn K., Große K., Wüste T und Lücker E. (2010): Der Duncker'sche Muskelegel - Daten und Fakten (Poster). 29. internationaler Veterinärkongress des BbT, 26.04 - 27.04.2010, Bad Staffelstein
- 7.8 Riehn K., Große K., Hamedy A., Wüste T., Kabelitz P. und Lücker E (2009) *Alaria alata* – studies on detection, prevalence and biology of a re-emerging parasite (Abstract zum Poster) . 61st Annual Meeting of the German Society for Hygiene and Microbiology, Göttingen
- 7.9 Riehn K., Hamedy A.und Lücker E. (2009). *Alaria alata* – a re-emerging parasite? (Abstract zum Poster) ECVPH Annual Conference, Leipzig, Germany
- 7.10 Möhl K., Fehlhaber, K. Ludewig M. und Lücker E. (2009) Lebensmittelassoziierte parasitäre Zoonosen – alte Probleme und neue Herausforderungen (Abstract zum Vortrag). DVG-Fachgruppe "Parasitologie und parasitäre Krankheiten" 17. bis 19. Juni 2009, Leipzig, Germany
- 7.11 Möhl K., Große K., Hamedy A., Kabelitz P., Wüste T. und Lücker E. (2009) Untersuchungen zum Nachweis und zur Prävalenz des Duncker'schen Muskelegels in Wildtierpopulationen - Erste Ergebnisse (Abstract zum Vortrag). 50. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Germany, 29.09.-02.10.2009
- 7.12 Riehn K., Hamedy A., Große K., Wüste T., Kabelitz P. und Lücker E. (2010) Untersuchungen zum Nachweis und zur Prävalenz des Duncker'schen Muskelegels in Wildtierpopulationen - Erste Ergebnisse (Abstract zum Vortrag). 5. Leipziger Tierärztekongress 21.01-23.012010, Leipzig, Germany
- 7.13 Riehn K., Hamedy A., Große K., Kabelitz P., Wüste T., Zeitler L. und Lücker E (2010) Untersuchungen zum Nachweis und zur Prävalenz des Duncker'schen Muskelegels in Wildschweinen - ein Update (Abstract zum Vortrag). 10. Fachtagung Fleisch- und Geflügelfleischhygiene 2.03.-03.03.2010, Berlin, Germany

- 7.14 Riehn K., Große K. und Lücker E. (2010) Monitoring-Untersuchungen hinsichtlich des Vorkommens des Duncker'schen Muskelegels bei Wildschweinen (Beschlussvorschlag). 15. Sitzung der Länderarbeitsgemeinschaft Verbraucherschutz, 18. und 19. Mai 2009, Stuttgart
- 7.15 Riehn K., Große K. und Lücker E. (2010) Nachweis des Duncker'schen Muskelegels im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung mittels des modifizierten Larvenauswanderungsverfahrens (*Alaria alata* mesocercariae migration technique, AMT) (Beschlussvorschlag). 65. Arbeitstagung des ALTS, 14.- 16. Juni 2010, Berlin
- 7.16 Zeitler L., Hamedy A., Riehn K. und Lücker E. (2010) Untersuchungen zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung (Abstract zum Poster). 51. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, 28.09.-01.10.2009, Garmisch-Partenkirchen
- 7.17 Riehn K., Große K., Hamedy A., Kabelitz P., Wüste T., Zeitler L. und Lücker E. (2010) *Alaria alata* – Nachweis, Prävalenz und Risikobewertung (Abstract zum Vortrag). 51. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG, 28.09.-01.10.2009, Garmisch-Partenkirchen
- 7.18 Riehn K., Fehlhaber K., Ludewig M. und Lücker E. (2010) Parasitäre Zoonosen im Aufwind – eine Herausforderung für die Lebensmittelhygiene? BbT Seminar „Lebensmittelparasitologische Probleme“, 4. November 2010, Fulda
- 7.19 Kurzfassung
- 7.20 Abstract
- 7.21 Darstellung, Wertung sowie mögliche Umsetzung oder Anwendung der Ergebnisse

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 <i>Alaria alata</i> : Wirtsbeziehungen	14
Abbildung 2: <i>Alaria alata</i> : Morphologie der Adultform und der Mesozerkarie	15
Tabelle 1: <i>Alaria</i> Mesozerkariosen beim Menschen ("larvale Alariose")	17
Tabelle 2: Übersicht über die Tiere, aus denen Mesozerkarien für die molekularbiologische Identifizierung und die AFLP Analyse gewonnen wurden	31
Tabelle 3: Morphologische und morphometrische Kennzeichen von <i>Alaria alata</i> Mesozerkarien	32
Tabelle 4: Überblick über die in der PCR verwendeten Primer sowie die Zusammensetzung der Mastermix und das verwendete Amplifikationsprogramm	33
Abbildung 3: <i>Alaria</i> spp. Mesozerkarien in direktem Kontakt mit 5 ml HCl/Pepsin	36
Abbildung 4: Stereomikroskopische Aufnahmen von Analysesieben	36
Tabelle 5: Effektivität des MRV gegenüber der AMT bei der Identifikation von <i>A. alata</i> Mesozerkarien in Gewebeproben	39
Tabelle 6: Untersuchung verschiedener Medien zur Larvenauswanderung	40
Tabelle 7: Untersuchungen zur Optimierung der Auswanderzeit (0,5-4 h)	41
Tabelle 8: Untersuchungen zur Optimierung des Zerkleinerungsgrades	42
Abbildung 5: Durchschnittliche Anzahl von <i>A. alata</i> Mesozerkarien pro 100 g Gewebe und Anteil der Tieren mit einem positiven Ergebnis in diesem Gewebe	43
Tabelle 9: An das Institut für Lebensmittelhygiene überstellte Wildschweine	43
Tabelle 10: Nachweis von <i>Alaria alata</i> Entwicklungsstadien in verschiedenen Wildtieren	43
Tabelle 11: Umfragerückmeldungen zu positiven DME-Befunden aus den Bundesländern in den Jahren 2008 und 2009	43
Tabelle 12: Überblick zur Befundsituation in den Kreisen mit DME-Funden	43
Abbildung 6 Graphische Darstellung zur Umfrage Duncker'scher Muskelegel und Schwarzwildunterschung (Erhebungsbögen) bis Ende 2009	43
Tabelle 13: Überblick zur Befundsituation in den Kreisen mit DME-Funden	43
Abbildung 7: PCR Analyse eines Parasiten Isolates	43
Tabelle 14: Untersuchung von Rohwürsten aus mesozerkarienhaltigem Ausgangsmaterial	43

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Die Ziele und Aufgabenstellung des Projektes sind in der Leistungsbeschreibung (Zuwendungsbescheid der BLE „Forschungsvorhaben „Untersuchungen zur Prävalenz des Duncker’schen Muskelegels (DME) in Wildtierpopulationen“ vom 23.07.2008) definiert:

Bei der Untersuchung von Wildschweinen im Land Brandenburg wurde als Zufallsbefund wiederholt der Duncker’sche Muskelegel (DME) nachgewiesen. Der Duncker’sche Muskelegel stellt eine Vorstufe des parasitisch lebenden Saugwurms Alaria alata dar. In einer vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) hierfür erstellten Risikobewertung wird die Gefahr gesehen, dass Verbraucher beim Verzehr von infiziertem, nicht ausreichend erhitztem Fleisch von Wildschweinen an der larvalen Alariose erkranken können. Bei dieser Krankheit handelt es sich somit um eine lebensmittelassoziierte Zoonose. Erkenntnisse zur Vorkommenshäufigkeit, zur Organverteilung im Tierkörper sowie zur geographischen Verteilung des Duncker’sche Muskelegels liegen nicht, bzw. für nur außerordentlich wenige Einzelfälle vor. Die parasitologische Diagnostik weist offensichtlich erhebliche Defizite auf. Deshalb ist im Rahmen dieses Vorhabens zu klären, ob mit den derzeit verfügbaren amtlichen parasitologischen Untersuchungsmethoden (auf Trichinellen) ein zuverlässiger Erregernachweis möglich ist. Falls dies nicht der Fall sein sollte, ist eine sichere parasitologische Nachweismethode zu entwickeln. Gegebenenfalls ist die Entwicklung einer Schnellmethode für die amtliche Untersuchung zu prüfen. Des Weiteren ist zur Klärung der Prävalenz des Erregers eine Status-Quo-Erhebung in der Wildtierpopulation, insbesondere der Wildschweinpopulation, durchzuführen. Die Datenerhebung ist insbesondere in Regionen durchzuführen, in denen bereits erste Fälle aufgetreten sind. Außerdem ist auf Grundlage der erarbeiteten Prävalenzdaten eine Bewertung der Relevanz des Erregers für die Gesundheit des Menschen vorzunehmen. Die Bearbeitung der Problemstellung hat sich an den Prinzipien der Risikoanalyse zu orientieren. Neben den Studien zur Untersuchungsmethodik hat auch eine Auswertung der internationalen Literatur zu erfolgen.

Im Laufe der ursprünglich anberaumten Projektlaufzeit von 12 Monaten zeigte sich deutlich, dass das bislang eingesetzte Referenzverfahren für die künstliche Verdauung von Sammelproben nach VO (EG) Nr. 2075/2005 (Official *Trichinella* digestion method, TIM) nicht geeignet für den Nachweis des Duncker’schen Muskelegels in Gewebeproben ist, da die Methode hier erhebliche Schwächen bei der Auswahl des Untersuchungsmaterials und der Durchführung der Untersuchung aufweist. Dies machte die Entwicklung einer speziellen Nachweismethode für den Duncker’schen Muskelegel notwendig. Bei der Methodenentwicklung stand neben einer hohen Wiederfindungsrate in verschiedenen Körpergeweben (Muskulatur, Fett und Bindegewebe) der Erhalt der Vitalität der Parasiten während der Untersuchung im Fokus

des Interesses. Ausgehend von den eigenen Untersuchungen sowie Hinweisen in der Literatur über die Affinität des DME zu Fettgewebe, wurde ein Verfahren zur Verdauung von Fettgewebe (Lipid digestion method, LDM) entwickelt. Es basiert auf der Simulation der Fettverdauung im Dünndarmbereich von Säugetieren und nutzt eine kommerziell erhältliche Enzymmischung (Lipase, Amylase, Protease) sowie das schon bei der amtlichen Trichinellenuntersuchung eingesetzte Magnetührverfahren. Aufbauend auf den Ergebnissen und Beobachtungen die aus den Untersuchungen zur Anwendung der Lipidverdauung gewonnen werden konnten, wurde in der Folge ein modifiziertes Larvenauswanderverfahren (*Alaria alata* mesocercariae migration technique, AMT) entwickelt und erstmals erfolgreich für den Nachweis von *Alaria alata* Mesozerkarien eingesetzt.

Im Rahmen der methodologischen Untersuchungen zeigte sich zudem, dass die Parasiten neben einer ausgesprochen weitgefächerten Verteilung im Tierkörper erheblich morphologische und morphometrische Unterschiede aufweisen und zudem Unterschiede in der Tenazität gegenüber verschiedenen chemischen und physikalischen Einflüssen erkennen lassen. Die beiden letztgenannten Punkte können auch als ein Hinweis auf das Vorkommen verschiedener *Alaria* Spezies in Westeuropa gewertet werden.

Mit dem Änderungsbescheid vom 28.07.2009, der eine Aufstockung von Bundesmitteln und eine Laufzeitverlängerung von 12 Monaten beinhaltet, wurden zusätzlich folgende neue Arbeitsziele definiert:

- *Weiterentwicklung und Optimierung der neuentwickelten Nachweismethoden*
- *Untersuchungen zur Vitalität bzw. Tenazität des Parasiten im Nachweisverfahren bzw. gegenüber verschiedenen chemisch-physikalischen Einflüssen (Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration). Diese Untersuchungen müssen mit molekularbiologischen Methoden zur Klärung genetischer Unterschiede im Hinblick auf Spezies bzw. Subspezies Differenzen unterlegt werden*

Im ursprünglichen Projektantrag wurden zur Umsetzung der oben genannten Ziele folgende Meilensteine definiert:

- * **1 Methodik:** Überprüfung der in der amtlichen Trichinellenuntersuchung eingesetzten Methodik und Erarbeitung einer optimierten Methodik zur Erfassung des Duncker'schen Muskelegels in Fleisch von Wildtieren, insbesondere von Wildschweinen.
- * **2 Prädilektionsstellen:** Feststellung der für den Nachweis des Duncker'schen Muskelegels am besten geeigneten Lokalisation für die Probeentnahme beim Wildschwein.
- * **3 Prävalenz:** Erfassung von Häufigkeit und Befallsstärke des Duncker'schen Muskelegels in Wildbret unter besonderer Berücksichtigung von potentiell endemischen Gebieten.
- * **4 Risikobewertung:** Bewertung des alimentären humanen Expositionsrisikos durch den Duncker'schen Muskelegel in Wildbret.

Im Rahmen der Laufzeitverlängerung des Projektes kam ein fünfter Meilenstein hinzu:

- * **5 Spezies/Tenazität:** Identifizierung von Speziesunterschieden auf morphologischer und insbesondere molekularbiologischer Ebene hinsichtlich Tenazität und Verteilung des Duncker'schen Muskelegels in Wildbret.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Für den Berichtszeitraum vom Projektbeginn im September 2008 bis zum Termin der Abgabe des Abschlussberichts am 31. August 2010 wurden in Anlehnung an die unter Punkt 1 aufgeführten wissenschaftlichen Arbeitsziele die nachfolgend näher beschriebenen Arbeitsschritte durchgeführt:

- die Eignungsprüfung und Optimierung der amtlichen Methodik der Trichinellenuntersuchung bzw. die Entwicklung einer geeigneten Nachweismethode für *Alaria alata* Mesozerkarien in Wildfleisch;
- die Identifizierung der am besten geeigneten Probenentnahmestellen für den Nachweis des Duncker'schen Muskelegels mit Hilfe von Verteilungsuntersuchungen;
- die Erfassung der geographischen Häufigkeit des Vorkommens des Duncker'schen Muskelegels und seiner Befallsstärke in Wildbret durch stichprobeweise Untersuchung verschiedener Wildbestände in Deutschland und eine fragebogenbasierte Umfrage zu Häufigkeit des Auftretens des Parasiten in 413 Kreisen und kreisfreien Städte der Bundesrepublik Deutschland;
- die Überprüfung der Tenazität der Mesozerkarien gegenüber verschiedenen physikalischen und chemischen Parametern im Hinblick auf das alimentäre humane Expositionsrisiko sowie die Optimierung der PCR-Methode zum Nachweis von *Alaria alata*-Isolaten und Erfassung der genetischen Diversität innerhalb der europäischen *Alaria alata*-Population mithilfe der AFLP-Analyse;
- Bewertung des humanen Expositionsrisikos, das von mit dem Duncker'schen Muskelegel befallenen Fleisches ausgeht, auf der Basis der erarbeiteten Daten.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

1.2.1 Einleitung

Der Duncker'sche Muskelegel (DME) wurde bei Wildschweinen als Zufallsbefund im Rahmen der routinemäßigen amtlichen Untersuchung auf Trichinellen in letzter Zeit mehrfach beschrieben (Übersicht bei: Große und Wüste 2006). Der Duncker'sche Muskelegel ist ein Entwicklungsstadium von *Alaria alata*, einem Parasiten der Überklasse der Saugwürmer (Trematoda), der im Dünndarm von verschiedenen Fleischfressern als Adultstadium lebt. Als erster Zwischenwirt dienen dem Parasiten Süßwasserschnecken (Planorbidae), in denen sich die so genannten Zerkarien entwickeln. Im zweiten Zwischenwirt, vorzugsweise Kaulquappen (Anuren), entwickeln sich die Mesozerkarien, die nach einem weiteren Entwicklungsschritt (Metazerkarialstadium) im Endwirt zu adulten Parasiten heranreifen. Wird das Mesozerkarialstadium hingegen von einem so genannten paratenischen Wirt oder Stapelwirt aufgenommen, so erfolgt in diesem keine Weiterentwicklung sondern nur eine Anreicherung der Mesozerkarien. Als paratenische Wirte dienen neben verschiedenen Säugetieren auch Amphibien, Reptilien und Vögeln. Durch die Tatsache, dass paratenische Wirte nicht nur potentielle Endwirte infizieren, sondern sich vielmehr auch untereinander anstecken können wird der Infektionszyklus dieses Parasiten erheblich erweitert. Bei Menschen hat der Verzehr von mesozerkarienhaltigem Fleisch (Froschschenkel, Wildgansfleisch, jeweils nicht durcherhitzt) zum Teil schwerwiegende Erkrankungen verursacht, in einem Fall mit Todesfolge (Fernandes et al. 1976, Freeman et al. 1976, McDonald 1994, Kramer et al. 1996). Eine abschließende Beurteilung einer gesundheitlichen Gefährdung der Verbraucher ist derzeit nach Auffassung des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR 2007) infolge mangelnder Kenntnisse über die Eignung der Nachweismethode und, damit direkt verbunden, über die Häufigkeit des Vorkommens nicht möglich.

1.2.2 *Alaria alata* - Geschichte und Taxonomie

Die Erstbeschreibung des Adultstadiums („*Alaria alata*“) im Endwirt erfolgte durch Goeze schon im Jahr 1782. Das Larvalstadium der Trematodenart („*Distoma tetracystis*“) wurde 1854 von Gastaldi erstmalig in Fröschen und 1896 von Duncker bei Schweinen im Rahmen der Untersuchung auf Trichinellen beschrieben. Erst 1942 erfolgte die Entsprechung durch Bugge, der die Mesozerkarien dieser Trematoden sowohl im Schwein, als auch im Frosch nachwies. Die Verbindung zu *A. alata* wurde 1953 durch Stefanski und Tarczynski bewiesen. *Alaria alata* (Goeze 1896) gehört zu den parasitären Trematoden (Saugwürmern) und wird dort der Gattung Strigeata und Familie Diplostomatidae zugeordnet.

Der Begriff „Duncker'scher Muskelegel“ bezieht sich aus historischen Gründen auf das zweite Zwischenwirtstadium (Mesozerkarie) von *A. alata* beim Schwein. Synonyme für den Begriff „Duncker'scher Muskelegel“ sind „*Distomum musculorum suis*“ oder „*Agamodistomum suis*“.

1.2.3 Wirtsspektrum

Das Wirtsspektrum von *Alaria alata* ist aufgrund des dreistufigen Entwicklungszyklus mit eingeschobenem Mesozerkarialstadium ausgesprochen breit. Eine Übersicht über die verschiedenen Wirtsspezies der einzelnen Entwicklungsstadien geben Möhl et al. (2009).

1.2.4 Entwicklungszyklus

Der Lebenszyklus von *A. alata* verläuft 3-wirtig unter fakultativer Einschaltung von paratenischen Wirten (Stapelwirten) im zweiten Zwischenwirtstadium. Eine Übersicht zum Entwicklungszyklus gibt Abbildung 1. Die Eier des Parasiten werden mit dem Kot des Endwirtes ausgeschieden. Im wässrigen Milieu schlüpfen so genannte Wimpernlarven (Mirazidien). Die Mirazidien gelangen in den ersten Zwischenwirt (Tellerschnecken) entweder aktiv durch Penetration der Haut oder passiv durch orale Aufnahme. In den Wasserschnecken erfolgt die Entwicklung zu Muttersporocysten, aus denen sich Tochttersporocysten bilden. Aus diesen entstehen die Zerkarien, die die Schnecke aktiv verlassen. Nach der Anheftung an die Oberfläche von Kaulquappen, wird deren Haut durchbohrt und die Zerkarie besiedelt unter dem Verlust ihres Schwanzes das Körperinnere des Wirtes. Aus der Zerkarie entsteht die Mesozerkarie. Nach Aufnahme der Mesozerkarie durch einen Stapelwirt sistiert die weitere Entwicklung zur Adultform. Die Mesozerkarie ist nach Penetration (Magen-, Darmwand; Haut), ähnlich wie beim zweiten Zwischenwirt, in den Organen der Brust- und Bauchhöhle und in der anliegenden Muskulatur, einschließlich dem Fettgewebe lokalisiert. Die Aufnahme durch paratenische Wirte kann sich auch mehrfach wiederholen.

Wird die befallene Kaulquappe oder der daraus entstandene Froschlurch hingegen von einem geeigneten Endwirt aufgenommen, entwickelt sich in diesem aus der Mesozerkarie eine Metazerkarie und schließlich ein adulter fortpflanzungsfähiger Trematode. Die Entwicklung zur Metazerkarie erfolgt in der Lunge des Endwirtes, hierfür macht die aufgenommene Mesozerkarie eine Körperwanderung durch, bei der sie vom Magen-Darmtrakt aus, durch die Bauchhöhle, in die Lunge wandert. Nach der Metamorphose wandert die Metazerkarie über die Speiseröhre zurück in den Magen-Darmtrakt, wo sie geschlechtsreif wird.

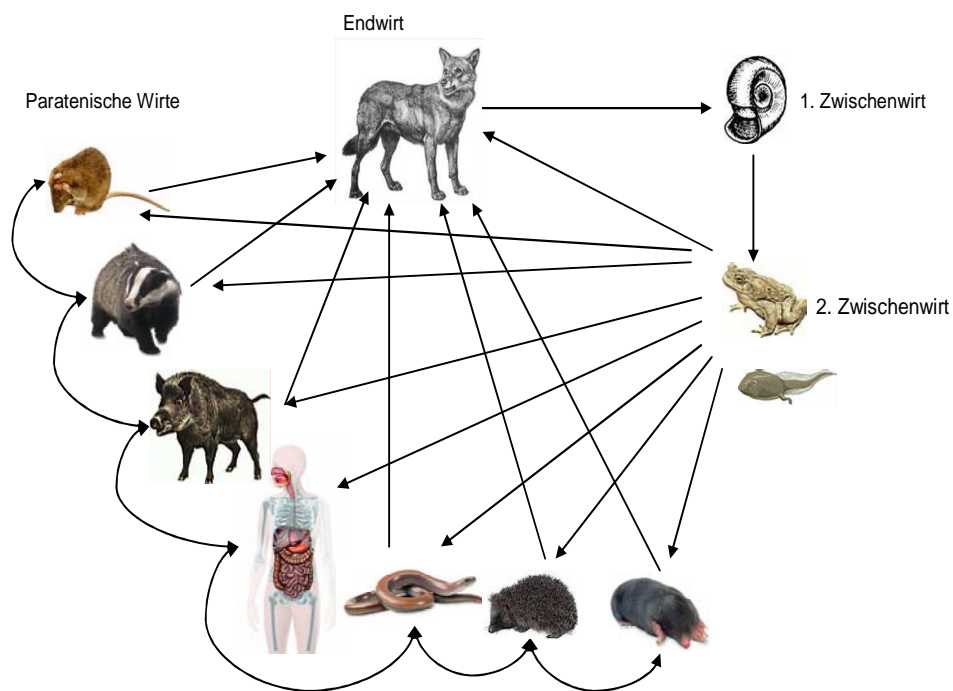


Abbildung 1 Mögliche Beziehungen zwischen den Wirten der einzelnen Stadien von *A. alata*

1.2.5 Morphologie der *A. alata* Mesozerkarie

Die *A. alata* Mesozerkarie ist *intra vitam*, z. B. in der Verdauungsflüssigkeit, durch eine charakteristische Beweglichkeit mit Streck- und Abrundungsstadium in der stereomikroskopischen Untersuchung sehr auffällig. Nach Große und Wüste (2006) ist sie in der Verdauungslösung bei der Trichinellen-Untersuchung „nicht zu übersehen“. Im ruhenden Stadium hat sie nach Andreas (2006) eine ovale Form, mit einer Länge zwischen 0,56 – 0,93 mm und einer Breite 0,55 – 0,70 mm. Der Mundsaugnapf misst 0,055 – 0,067 x 0,062 – 0,078 mm, der Bauchsaugnapf 0,039 – 0,099 x 0,042 – 0,094 mm. Charakteristisch sind die vier großen Bohrdrüsen im Vorderkörper der Mesozerkarien, sowie die kurzen Darmschenkel, hinzu kommt ein stark verzweigtes Exkretionssystem auf beiden Körperseiten. Weitere Details sind der Abbildung 2 zu entnehmen.

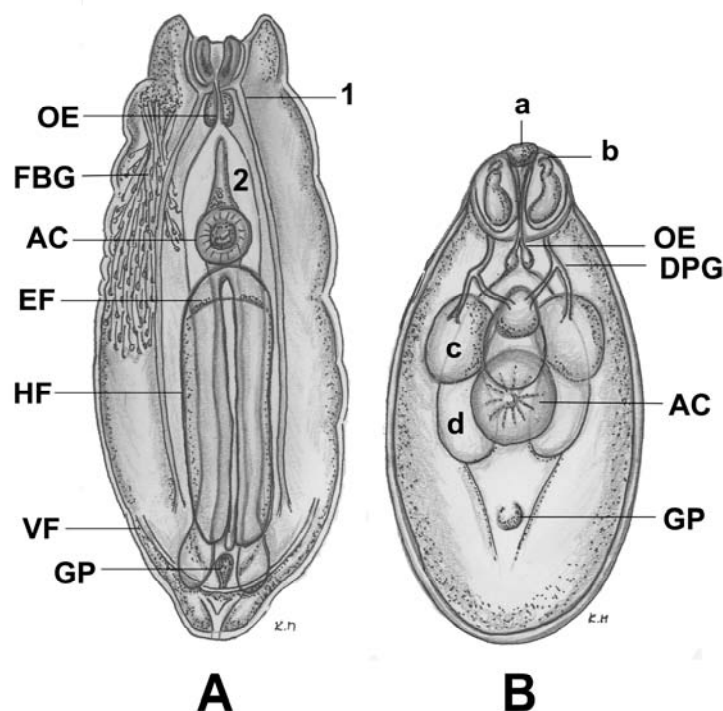


Abbildung 2: Voll entwickelte Adultform (A) und Mesozerkarie (B) von *Alaria* spp. 1 Reste des Penetrationsdrüsengangs, 2 Zäkum (elongiert), OE Oesophagus, FBG Vorderkörperdrüsen und ihre Ausführungsgänge, AC Azetabulum, HF Anhaftungsorgan, VF Ventrale Kante des spatelförmigen Vorderkörpers, GP Genitalprimordium, a Mundöffnung und Mundsaugnapf, b Drüsenzellen, c Penetrationsdrüsen, d Zäkum, DPG Ausführungsgang einer Penetrationsdrüse

1.2.6 Vorkommen

Eine Zusammenstellung der Literatur geben Große und Wüste (2006, 2008). Grundsätzlich muss mit einem bedeutsamen Vorkommen von *A. alata* Mesozerkarien in Wildtierpopulationen in wasserreichen Gebieten und bei Vorhandensein der Wirtspezies (Schnecken, Froschlurche, Endwirte) gerechnet werden. Mehlhorn (2008) geht im Falle von *Alaria alata* von einer Erreger-Prävalenz von etwa 30% in verschiedenen Wildcaniden aus. In einigen Gebieten zeigen die Untersuchungen bei bestimmten Spezies sogar noch deutlich höhere Prävalenzen. So sind 89% der Wölfe in Estland (Moks 2006), 42,6% der Füchse in Weißrussland (Shimalov et al. 2003) und 70% der Marderhunde in Ostdeutschland (Schuster 1993) Träger der Parasiten.

1.2.7 Pathogenität

Die Pathogenität der Adultform von *A. alata* wird als gering eingeschätzt. Dagegen hat bereits Odening (1961) auf die potentielle Schädigung im paratenischen Wirt, insbesondere nach Massenbefall durch wiederholte Aufnahme, hingewiesen. Er schloss eine Infektion des Menschen nicht aus.

Hiepe (1985) wies darauf hin, dass dieser Parasit in Mitteleuropa selten bei Haustieren nachgewiesen wurde und wenig Beachtung fand. In Wildtieren findet sich der Parasit hingegen regelmäßig. *Alaria alata* als potentieller Parasit des Menschen im Stadium der Mesozerkarie, also als Zoonoseerreger, sollte dem zufolge weiterhin Aufmerksamkeit gewidmet werden. Seit 1973 sind einige Berichte über *Alaria* Mesozerkariosen („larvale Alariose“) des Menschen erschienen. Eine Übersicht gibt Tabelle 1. Das Spektrum reicht von geringgradigen Symptomen (respiratorische Organe, Haut) über ernsthafte Erkrankungen der Augen bis zu einem Todesfall nach Aufnahme einer offensichtlich massiven Infektionsdosis. Implizierte Vektoren sind insbesondere Froschschenkel aber auch Fleisch von Wildgänsen. In allen Fällen wird vermutet, dass kein hinreichendes Durcherhitzen stattfand. Berichte aus Deutschland liegen bislang nicht vor. Allerdings muss infolge des geringen Bekanntheitsgrades dieser Zoonose sowie der schlechten Nachweisbarkeit der Mesozerkariose von einer hohen bis sehr hohen Dunkelziffer ausgegangen werden. Mehrfach beschrieben ist in Europa hingegen eine durch Parasitenbefall bedingte diffuse unilaterale subakute Neuroretinopathie (DUSN) (Harto et al. 1999, Küchle und Naumann 1996, Küchle et al. 1993, Oueghlani et al. 2010).

Da sich die klinische Diagnostik primär auf den Fundusbefund sowie auf das Differentialblutbild, auf spezifische Enzymimmunoassays (Blut und Liquor) und auf das Fluoreszenzangiogramm (Sichtbarmachung subretinaler Larva migrans "tracks") stützt und nur bei 25% der Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose einer DUSN zum Zeitpunkt der Erstvorstellung ein mobiler Wurm entdeckt werden kann (Stokkermans 1999), ist die Identifizierung der Parasitenspezies nicht immer zu gewährleisten.

Tabelle 1: *Alaria* spp. Mesozerkariosen beim Menschen ("larvale Alariose")

Jahr	Parasit	Ort	N	Manifestation	Infektionsweg/Vektor	Autor
1969	<i>Alaria</i> (?) Meso-zerkarien	CA, USA	1	Auge	(?), (?)	Byers & Kimura, 1974, McDonald et al. 1994
1972	<i>Alaria</i> Meso-zerkarien	Ontario CAN	1	Auge	Schmier-Infektion bei der Zubereitung von Froschschenkeln	Shea et al. 1973
1975	<i>Alaria americana</i> Mesozerkarien	Ontario, CAN	1	Generalisiert (mit Todesfolge)	A (Froschschenkel)	Fernandes et al. 1976; Freeman et al. 1976
1975	<i>Alaria</i> Mesozerkarien	LA, USA	1	Haut	A (Wild, Waschbärfleisch (?))	Beaver et al. 1977
1988	<i>Alaria</i> Mesozerkarien	CA, USA	1	Auge	A (Wild) oder Froschschenkel (MSI)	McDonald et al. 1994
1990	<i>Alaria americana</i> Mesozerkarien	CA, USA	1	Auge	A (Wild) oder Froschschenkel (MSI)	McDonald et al. 1994
1993	<i>Alaria americana</i> Mesozerkarien	CAN	1	Resp. Trakt, Auge	A (Wildgans (?))	Kramer et al. 1996

N: Fälle; (?): nicht bestätigt, unbekannt; MSI: Mögliche Schmier-Infektion; A: alimentär

1.2.8 Risikobewertung

Im Einklang mit der Stellungnahme des Bundesinstituts für Risikobewertung vom 01.07.2007 kann die aktuelle Beurteilung des Risikos, das von mit dem Duncker'schen Muskelegel befallenen Wildschweinfleisch ausgeht, wie folgt zusammengefasst werden:

1. Ein potentielles Risiko für die Verbraucher ist derzeit nicht auszuschließen. Die Dunkelziffer humaner Mesozerkarien-Infektionen ist unbekannt. Erkenntnisse über die Häufigkeit des Vorkommens des Muskelegels liegen nicht vor. Das BfR sieht dem zufolge die Notwendigkeit, bei positiven Befunden das Fleisch von Wildschweinen nicht für den Verzehr frei zugeben.
2. Da bislang auch keine Informationen über die Verteilung des Muskelegels in Wildschweinen vorliegen, bleibt derzeit nur die Untauglichkeitsbeurteilung des gesamten erlegten Stückes.
3. Routinemäßig wird derzeit nicht auf den Befall mit dem Duncker'schen Muskelegel untersucht. Positive Befunde sind bei der amtlichen Untersuchung auf Trichinellen erhobene Zufallsbefunde; deren Bewertung ist mangels Informationen über die analytische Verlässlichkeit der Methodik, die auf Trichinellen und nicht auf den Duncker'schen Muskelegel optimiert wurde, derzeit nicht möglich.
4. Bislang liegen nur wenige Berichte über positive Befunde beim Wildschwein vor. Diese wurden ausschließlich im Rahmen der amtlichen Untersuchung auf *Trichinella* mit der nach VO (EG) 2075/2005 zugelassenen Verdauungsmethode (Magnetrührverfahren) erhoben.
5. Alle Angaben in der Literatur deuten darauf hin, dass die bei Trichinellen üblicherweise zur Untersuchung kommenden Proben nicht bzw. nicht vollständig mit den Prädilektionsstellen des Duncker'schen Muskelegels übereinstimmen. Für das Wildschwein gibt es derzeit keine Angaben über die Verteilung des Duncker'schen Muskelegels in den verschiedenen Geweben.
6. Darüber hinaus ist unbekannt, in wie weit die routinemäßig nach VO (EG) 2075/2005 durchgeführten Verdauungsverfahren, die auf den Nachweis von *Trichinella* optimiert wurden, auch für den Nachweis des Duncker'schen Muskelegels geeignet sind.
7. Für eine abschließende oder, zumindest für die Belange des Risikomanagements, hinreichende Risikobewertung ist (a) die Entwicklung eines geeigneten Nachweisverfahrens für den Duncker'schen Muskelegel in Wildfleisch und (b) die Durchführung von Untersuchungen zur tatsächlichen Prävalenz, Befallsstärke und -verteilung mit dem optimierten Nachweisverfahren erforderlich.

2 Materialien und Methoden

2.1 Meilenstein „Methodik“

2.1.1 Materialien für die Durchführung des Referenzverfahrens zur künstlichen Verdauung von Sammelproben gem. VO (EG) Nr. 2075/2005 (Official *Trichinella* digestion method, TIM)

- a) Messer oder Schere und Pinzette zur Probenentnahme;
- b) Fleischwolf
- c) Mixer mit scharfer Klinge
- d) Magnetrührer mit temperaturgeregelter Heizplatte und teflonbeschichteten Rührstäben von ungefähr 5 cm Länge;
- e) mindestens 2 Liter fassende Scheidetrichter aus Glas, möglichst mit Teflonstopfen (Sicherheitsverschluss);
- f) Stative, Ringe und Klammern;
- g) Siebe, Maschenweite 180 Mikron, Außendurchmesser 11 cm, mit Maschen aus rostfreiem Stahl;
- h) Plastiktrichter mit mindestens 12 cm Innendurchmesser zum Einhängen der Siebe;
- i) 3 Liter fassende Glasbecher;
- j) Messzylinder aus Glas, 50 bis 100 ml Inhalt, oder Zentrifugierröhrchen;
- k) Trichinoskop mit Horizontaltisch oder Stereomikroskop mit in der Intensität einstellbarer Durchlichtquelle;
- l) einige Petrischalen mit 9 cm Durchmesser (für die Verwendung mit dem Stereomikroskop), deren Boden mit einem spitzen Gegenstand in Quadrate von 10 × 10 mm eingeteilt sind;
- m) ein Larvenzählbecken (für die Verwendung mit dem Trichinoskop), aus 3 mm starken Acrylplatten, mit nachstehenden Abmessungen:
 - i) der Boden des Gefäßes misst 180 × 40 mm und ist in quadratische Felder eingeteilt,
 - ii) die Seitenabmessungen betragen 230 × 20 mm,
 - iii) die Endstücke messen 40 × 20 mm. Boden und Enden sind so zwischen die Seiten zu kleben, dass zwei schmale Griffe an beiden Seiten entstehen. Die Oberseite des Bodens soll 7 bis 9 mm über den unteren Rand des aus den beiden Seiten und Enden gebildeten Rahmens herausragen. Die Teile sind mit materialgerechtem Klebstoff miteinander zu verbinden;
- n) Aluminiumfolie;

- o) 25%ige Salzsäure;
- p) Pepsin, Stärke 1: 10 000 NF (US National Formulary) entsprechend 1: 12 500 BP (British Pharmacopoea) entsprechend 2 000 FIP (Fédération Internationale de Pharmacie);
- q) Leitungswasser, auf 46 bis 48 °C erhitzt;
- r) eine auf mindestens 0,1 g genaue Waage;
- s) Metallflachbehälter mit 10 bis 15 Liter Fassungsvermögen, für die verbleibenden Verdauungssäfte;
- t) Pipetten in verschiedenen Größen (1, 10, 25 ml) und Pipettenhalter;
- u) ein Thermometer, das im Bereich 1 bis 100 °C auf $\pm 0,5$ °C genau ist;
- v) Siphon für Leitungswasser.

2.1.2 Probenahme und zu verarbeitende Mengen

Aus dem Antebrachium, der Zunge oder dem Zwerchfell von Wildschweinen sind Proben von mindestens 10 g zu entnehmen.

Das angegebene Gewicht von Fleischproben bezieht sich auf eine Probe von Fleisch, das frei ist von Fett und Bindegewebe. Besondere Aufmerksamkeit ist erforderlich bei der Probenahme von Muskelgewebe aus der Zunge, um Kontamination mit der Oberflächenschicht der Zunge zu vermeiden, die unverdaulich ist und die Analyse des Sediments verhindern kann.

2.1.3 Verfahren

I. Vollständige Ansätze (gleichzeitige Untersuchung von Proben mit einem Gesamtgewicht von 100 g)

- a) $16 \pm 0,5$ ml Salzsäure wird in einen 3-Liter-Behälter mit 2,0 Liter Leitungswasser gegeben, auf 46 bis 48 °C vorerhitzt; ein Rührstab wird im Behälter platziert, der Behälter wird auf die vorgeheizte Platte gestellt und der Rührvorgang gestartet.
- b) $10 \pm 0,2$ g Pepsin werden hinzugefügt.
- c) 100 g Probenmaterial wird im Mixer zerkleinert.
- d) Das zerkleinerte Fleisch wird in einen 3-Liter-Behälter gegeben, der Wasser, Pepsin und Salzsäure enthält.
- e) Das Schneidewerk des Mixers wird mehrfach in die Verdauungsflüssigkeit des Behälters eingetaucht, und die Mixerschüssel wird mit einer kleinen Menge der Verdauungsflüssigkeit ausgespült, um noch anhängendes Fleisch zu entfernen.
- f) Der Behälter wird mit Aluminiumfolie abgedeckt.
- g) Vor Beginn des Rührvorgangs ist der Magnetrührer so einzustellen, dass er während des gesamten Rührvorgangs eine konstante Temperatur von 44 bis 46 °C hält. Während des Rührvorgangs sollte die Verdauungsflüssigkeit so schnell drehen, dass ein tiefer zentraler Wirbel entsteht, ohne dass Flüssigkeit herausspritzt.

- h) Die Verdauungsflüssigkeit wird gerührt, bis die Fleischpartikel verschwinden (etwa 30 Minuten); danach wird das Rührgerät abgeschaltet und die Verdauungsflüssigkeit durch das Sieb in den Scheidetrichter zur Sedimentation gegossen. Bei der Verarbeitung bestimmter Fleischarten (Zunge, Wildfleisch usw.) können längere Verdauungszeiten erforderlich sein (nicht mehr als 60 Minuten).
- i) Der Verdauungsvorgang gilt als zufrieden stellend, wenn nicht mehr als 5 % des ursprünglichen Gewichts der Probe auf dem Sieb bleiben.
- j) Die Verdauungsflüssigkeit soll im Trichter 30 Minuten lang stehen bleiben.
- k) Nach 30 Minuten werden 40 ml der Verdauungsflüssigkeit schnell in einen Messzylinder oder in ein Zentrifugierröhrchen abgelassen.
- l) Verdauungsflüssigkeiten und andere Flüssigabfälle bleiben in einem Flachbehälter, bis die Ergebnisse abgelesen sind.
- m) Die 40-ml-Probe wird 10 Minuten stehen gelassen, danach werden 30 ml des Überstands vorsichtig durch Absaugen der oberen Schichten entfernt, so dass ein Volumen von höchstens 10 ml verbleibt.
- n) Diese restlichen 10 ml der abgesetzten Probe werden in ein Larvenzählbecken oder in eine Petrischale gegossen.
- o) Dann wird der Messzylinder oder das Zentrifugierröhrchen mit höchstens 10 ml Leitungswasser gespült und diese Flüssigkeit der im Larvenzählbecken oder in der Petrischale befindlichen Probe hinzugefügt. Danach wird die Probe mittels Trichinoskop oder Stereomikroskop mit 15- bis 20facher Vergrößerung untersucht. Bei verdächtigen Bereichen oder parasitenähnlichen Formen ist die Vergrößerung auf 60- bis 100fach zu erhöhen.
- p) Die Sedimente müssen untersucht werden, sobald sie vorbereitet sind.

II. Ansätze mit einem Gesamtgewicht von weniger als 100 g

Falls erforderlich, können bis zu 15 g einem vollständigen Ansatz von 100 g hinzugefügt und mit diesem zusammen gemäß 3 I untersucht werden. Mehr als 15 g sind als vollständiger Ansatz zu untersuchen. Bei Ansätzen bis zu 50 g können Verdauungsflüssigkeit und Bestandteile reduziert werden: 1 Liter Wasser, 8 ml Salzsäure und 5 g Pepsin.

2.1.4 Materialien für die Durchführung des Magnetrührverfahrens zur künstlichen Verdauung Fettgewebe (Lipid digestion method, LDM))

Die Materialien sind weitgehend mit den unter 2.1.1 aufgeführten Arbeitsmitteln identisch. Es ergeben sich folgende Ausnahmen:

- o) Pankreatin (Nordmark)
- p) Galensäure sowie NaHCO_3 zur Einstellung des pH-Werts
- q) Leitungswasser, auf 37 °C erhitzt

2.1.5 Probenahme und zu verarbeitende Mengen

Aus dem Abdominalfett oder dem retroperitonealen Fettgewebe von Wildschweinen sind 25 g Probenmaterial zu entnehmen.

2.1.6 Verfahren

Das Verfahren ist weitgehend mit der unter 2.1.3 aufgeführten Arbeitsanweisung identisch. Es ergeben sich folgende Ausnahmen:

- a) 5 g Pankreatin und 1 g Galensäure werden in einen 3-Liter-Behälter mit 1,0 Liter Leitungswasser gegeben, auf 37 °C vorerhitzt; ein Rührstab wird im Behälter platziert, der Behälter wird auf die vorgeheizte Platte gestellt und der Rührvorgang gestartet.
- b) NaHCO_3 wird hinzugefügt bis ein pH Wert von 8 ($\pm 0,5$) eingestellt ist.
- c) 25 g Probenmaterial wird im Mixer homogenisiert.
- g) Vor Beginn des Rührvorgangs ist der Magnetrührer so einzustellen, dass er während des gesamten Rührvorgangs eine konstante Temperatur von 37°C hält. Während des Rührvorgangs sollte die Verdauungsflüssigkeit so schnell drehen, dass ein tiefer zentraler Wirbel entsteht, ohne dass Flüssigkeit herausspritzt.

Punkt II entfällt.

2.1.7 Materialien für die Durchführung des modifizierten Larvenauswanderungsverfahrens (*Alaria alata* mesocercariae migration technique, AMT)

- a) Messer oder Schere, Pinzette
- b) Schneidebrett
- c) Stativ, Stativring, Stativklemme
- d) Glastrichter, Ø 10 cm
- e) Kunststoffsieb, Ø 9 cm, Maschenweite 0,8 mm
- f) Gummischlauch, Ø 10 mm, 10 cm lang
- g) Schlauchklemme, 60 mm
- h) 50 ml Messzylinder aus Glas
- i) Trichinoskop mit Horizontaltisch oder Stereomikroskop mit in der Intensität einstellbarer Durchlichtquelle
- j) einige Petrischalen mit 9 cm Durchmesser (für die Verwendung mit dem Stereomikroskop), deren Boden mit einem spitzen Gegenstand in Quadrate von 10 × 10 mm eingeteilt sind
- k) ein Larvenzählbecken (für die Verwendung mit dem Trichinoskop), aus 3 mm starken Acrylplatten gem. VO (EG) Nr. 2075/2005, Anhang I, Kapitel I, Nr. 1 (m)
- l) Leitungswasser temperiert auf 35-37°C
- m) eine auf mindestens 0,1 g genaue Waage

2.1.8 Probenahme und zu verarbeitende Mengen

- a) 30 g Probenmaterial bestehend aus quergestreifter Muskulatur, Fett- und Bindegewebe und wenn vorhanden Drüsengewebe und/oder Lymphgewebe ist dem Tierkörper zu entnehmen
- b) Es wird empfohlen sechs Gewebeproben mit einem Einzelgewicht von etwa 5 g an verschiedenen Körperstellen der Karkasse zu entnehmen und zu einer Gesamtprobe von 30 g zusammenzuführen
- c) Geeignete Probennahmestellen sind "Backe" (verschiedene Lokalisationen der kaudo-ventralen Kopfregion die quergestreifte Muskulatur, Fett- und Bindegewebe, Drüsengewebe und lymphatisches Gewebe umfassen), Peritoneum mit retroperitonealem Fettgewebe, Zwerchfellpfeiler, Larynx mit anhaftendem Bindegewebe, Zunge, Kaumuskelatur (*Mm. masseter, temporalis, pterygoidei*).

2.1.9 Verfahren

- a) Der Glastrichter wird im Stativ fixiert, der Gummischlauch wird am Trichter fixiert und mit einer Schlauchklemme verschlossen.
- b) Das Sieb wird in den Trichter gelegt.
- c) 30 g Probenmaterial werden manuell grob zerkleinert (etwa 0,5 cm Kantenlänge), in das Sieb überführt und mit 150 ml lauwarmem Leitungswasser übergossen. Das Probenmaterial soll vollständig mit Wasser bedeckt sein.
- d) Der Probenansatz bleibt für 90 Minuten bei Raumtemperatur stehen.
- e) Nach dieser Zeit werden 20 ml Flüssigkeit schnell in einen Messzylinder abgelassen und in ein Larvenzählbecken/eine Petrischale überführt.
- f) Dann wird der Messzylinder mit höchstens 10 ml Leitungswasser gespült und diese Flüssigkeit der im Larvenzählbecken oder in der Petrischale befindlichen Probe hinzugefügt.
- g) Danach wird die Probe mittels Trichinoskop oder Stereomikroskop mit 15- bis 20facher Vergrößerung untersucht. Bei verdächtigen Bereichen oder parasitenähnlichen Formen ist die Vergrößerung auf 60- bis 100fach zu erhöhen.

2.2 Meilenstein „Prädilektionsstellen“

Dieser Meilenstein beinhaltet die Identifizierung der am besten geeigneten Probenentnahmestellen für den Nachweis des Duncker'schen Muskelegels mit Hilfe von Verteilungsuntersuchungen in positiven Tieren. Hierzu sollen verschiedene Probennahmestellen definiert und bei einer ausreichend großen Zahl von Tieren Proben aus diesen Regionen auf einen möglichen Befall mit DME untersucht werden.

2.2.1 Probenbeschaffung (bei Anfall DME-positiver Stücke)

Die Erstidentifikation DME-positiver Wildschweine im Rahmen der amtlichen Untersuchung auf Trichinellen erfolgt durch zum einen durch die Kooperationspartner Große/Wüste und Kabelitz, zum anderen durch verschiedene kooperierende Untersuchungsstellen vornehmlich in den Bundesländern Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Brandenburg und Schleswig Holstein. Das Einzugsgebiet der Proben umfasst somit einen Radius von etwa 500 km. Die Übergabe der DME-positiven, untauglich beurteilten Stücke erfolgt dann entweder durch die kooperierenden amtlichen Untersuchungsstellen oder durch den Verfügungsberechtigten selbst. Alle Tierkörper werden innerhalb von 48 h. nach Erstellung des Erstbefundes abgeholt und ins Institut für Lebensmittelhygiene befördert. Bis zur Zerlegung/Untersuchung, welche spätestens 24h nach Probeneingang erfolgt, werden die Karkassen bei +2°C gelagert. Bei der Zerlegung erfolgt eine erste makroskopische Untersuchung auf eventuell vorhandene Mesozerkarienzysten.

2.2.2 Probennahme

Das Probenmaterial wird an 14 anatomisch definierten Probenahmestellen entnommen; die Probennahmestellen umfassten Zwerchfellpfeiler, Zunge, Kaumusculatur (*Mm. masseter, temporalis, pterygoideus* lat.), Backe (Gewebe der caudoventralen Kopfregion mit Anteilen von Muskulatur, Fett-, Binde-, Lymph- und Drüsengewebe), Nacken, Schulter, distale Vordergliedmaße, Zwischenrippenmuskulatur, Lende, Rücken, Bauchmuskulatur (*Mm. rectus abdominis, obliquus externus et internus abdominis, transversus abdominis*), Keule, distale Hintergliedmaße und subkutanes Fettgewebe. Bei Tieren, die zum Zeitpunkt der Probennahme nicht bereits ausgeweidet waren, werden zusätzlich Proben von Kehlkopf mit anhängendem Bindegewebe, Oesophagus, Peritoneum mit retroperitonealem Fettgewebe, großem Netz, Herz, Leber, Milz, Niere und Lunge entnommen.

2.2.3 Untersuchung der Proben

Da die Untersuchungen zur Verteilung des Duncker'schen Muskelegels parallel zu den Untersuchungen zur Methodenentwicklung durchgeführt werden, kommen neben dem zu Beginn der Untersuchungen standardmäßig eingesetzten Referenzverfahren zur künstlichen Verdauung von Sammelproben gem. VO (EG) Nr. 2075/2005 auch die neuentwickelten Methoden zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels (LDM, AMT) zum Einsatz. Dabei wird die jeweils optimierte Methodik vergleichend zur konventionellen Trichinellen-Untersuchung angewendet.

2.3 Meilenstein „Prävalenz“

Dieser Meilenstein beinhaltet die Erfassung der geographischen Häufigkeit des Vorkommens des Duncker'schen Muskelegels und seiner Befallsstärke in Wildbret durch stichprobeweise Untersuchung verschiedener Wildbestände in Deutschland und eine fragebogenbasierte Umfrage zu Häufigkeit des Auftretens des Parasiten in 413 Kreisen und kreisfreien Städte der Bundesrepublik Deutschland.

2.3.1 Prävalenz I und II

Wie schon unter 2.2.1 beschrieben, wird die Prävalenzstudie I in einem das ganze Projekt durchziehenden Zeitraum von den Kooperationspartner als externe Untersuchungen im Rahmen der amtlichen Untersuchung auf Trichinellen mit der konventionellen Methodik (Magnetrührverfahren, Referenzverfahren nach EG-Verordnung 2075/2005) durchgeführt. Die so erhobenen Daten werden der gemeinsamen Auswertung für das Forschungsvorhaben zur Verfügung gestellt. Darüber hinaus werden die im Rahmen der Prävalenzstudie I als positiv identifizierten Stücke bzw. Proben für die Untersuchungen im Rahmen des Moduls „Methodik“ sowie für die zweite Prävalenzstudie (Prävalenz II) am Institut für Lebensmittelhygiene zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Erhebung mittels Fragebogen

Als Erweiterung der unter 2.3.1 beschriebenen Ansätze auf das gesamte Bundesgebiet wird ein Meldebogen genutzt, der bereits von einem Kooperationspartner auf einer Tagung im März 2008 sowie in einer weit verbreiteten Fachzeitschrift veröffentlicht wurde (Große und Wüste 2008).

Von März 2009 bis April 2010 werden per e-mail zwei Erhebungsbögen zu positiven Befunden „Duncker'scher Muskelegel“ (DME) während der Untersuchung auf Trichinellen an alle 413 Veterinärämter der Kreise und kreisfreien Städte in 16 Bundesländer der Bundesrepublik Deutschland verschickt. Zusätzlich werden im April 2010 alle zuständigen Ministerien um Unterstützung bei dem Forschungsprojekt per Brief mit den Mustern der Erhebungsbögen gebeten.

In den Erhebungsbögen werden folgende Daten erfragt:

2.3.2.1 Übersichtsbogen

- Anzahl der untersuchten Wildschweine pro Jahr;
- die davon mit Einzelansatz untersuchten Tiere und dabei gefundenen DME;
- die davon mit Sammelansatz untersuchten Tiere und die Zahl der positiven Sammelansätze;
- Gesamtzahl der Sammelansätze;
- die Anzahl der Einzeltierfindungen bei Nachuntersuchungen.

2.3.2.2 Einzelerhebungsbogen

- Angaben zur Behörde: Adresse, GKZ, Ansprechpartner;
- Angaben zum Wild: Wild-Nr., Wildart, Geschlecht, Gewicht;
- Angaben zum Erlegeort;
- Angaben zum Probematerial;
- Angaben zur Untersuchung.

Die Ergebnisse werden gesammelt, in Tabellen erfasst und mithilfe des Tier-Seuchen-Nachrichten-Programms (TSN-Programm) des Friedrich-Löffler-Instituts, Königs Wusterhausen, graphisch bearbeitet und in verschiedenen Karten dargestellt (s. auch Abbildung 6).

2.4 Meilenstein Spezies/Tenazität

Dieser Meilenstein umfasst die Überprüfung der Tenazität der Mesozerkarien im Hinblick auf verschiedene Temperatur/Zeit Profile. Weiterhin soll die Toleranz gegenüber pH- und a_w -Wert-Änderungen und Erhöhung der Kochsalzkonzentration bzw. die Tenazität gegenüber in der Rohwurstherstellung gängigen NPS-Konzentrationen überprüft werden. Zur genotypischen Charakterisierung phänotypisch differenter Isolate mittels PCR werden anhand der Gendatenbank für *Alaria alata* spezifische Primer-Sets zum DNA-Nachweis auf Gattungsebene aus einem DME-Pool bzw. aus einzelnen Individuen eingesetzt und eine eventuelle genetischen Diversität innerhalb der europäischen *Alaria alata*-Population mithilfe der AFLP-Analyse erfasst.

2.4.1 Herstellung von Rohwurst

Es werden Rohwürste aus hochpositivem Fleisch von im Institut eingegangenen Wildschweinen hergestellt. Die Hälfte der Würste wird zusätzlich nach dem Abfüllen mit je fünf lebenden Duncker'schen Muskelegeln dotiert. Während ihrer Reifung werden die Rohwürste täglich mithilfe der AMT untersucht.

2.4.1.1 Rezeptur

Entsprechend dem Rezept 2-017 „Salami“ aus Koch und Fuchs „Die Fabrikation feiner Fleisch- und Wurstwaren“ (2004) werden Gewürze und Zutaten zusammengestellt. Das Ausgangsmaterial wird in faustgroße Stücke geteilt und für kurze Zeit im Kühlraum gelagert. Das Fleisch wird in den Kutter gegeben, der dabei im langsamen Gang läuft. Hat der Kutter das Fleisch aufgenommen, ist es bis zu feinsten Körnung laufen zu lassen. Dann wird der Speck zugesetzt und bis zur gewünschten Körnung weitergekuttert. Salz und Gewürze müssen zeitgleich so zugesetzt werden, dass sie sich gut mit dem Wurstgut vermischen können. Am Ende des Kuttervorganges sollte die Masse leicht klumpen, damit sie sofort gekühlt werden kann.

2.4.2 Material und Herstellung im Rahmen des Versuchs

2.4.2.1 Material

500 g Fleisch von Zwischenrippe, Bauch (Wildschwein Nr. 53, hochpositiv: Zwischenrippe 38 Larven in 110 g, Bauch 116 Larven in 110 g); 15,0 g Nitritpökelsalz; 0,5 g Starterkulturen; 1,5 g Pfeffer

2.4.2.2 Vorarbeiten

Das Fleisch wird nicht wie in der Originalrezeptur angegeben angefroren, damit keine Muskeleigel unbeabsichtigt abgetötet werden.

2.4.2.3 Herstellung

Das Material wird gewolft (0,4 cm), gewürzt und von Hand vermengt. 2 x 30 g des Materials werden mit je 5 lebenden Muskelegeln versehen. Der Rest wird in Kunstdärme (Kaliber 40 mm) abgefüllt, so dass 12 Würste mit einem Gewicht von je 60 g hergestellt werden. Die Hälfte der Würste (6 Stück) wird nach der Herstellung mit je 5 vitalen Duncker'schen Muskeleigel beimpft.

2.4.2.4 Reifen

Die Würste werden zum Reifen bei 20°C und 90% Luftfeuchtigkeit aufgehängt.

2.4.3 Einfrierversuche

Insgesamt werden sieben Versuche durchgeführt bei denen die Proben unter kontrollierten Bedingungen eingefroren werden. Pro Versuchsansatz werden 330 g stark infiziertes Probenmaterial (mind. 1 Mesozerkarie/g Probenmaterial) grob zerkleinert und in Einzelproben zu je 110g aufgeteilt. Die Einzelproben werden bei -20°C für 24 h, 72 h und 10 Tage eingefroren und anschließend mittels Magnetrührverfahren und AMT untersucht

2.4.4 Einfrierversuch mit Flomen vom Hausschwein

Grob zerkleinertes Flomen vom Hausschwein wird mit lebenden Mesozerkarien beimpft und das so hergestellte Probenmaterial nach verschiedenen Temperatur/Zeit Verläufen mittels der AMT untersucht.

2.4.5 Molekularbiologische Untersuchungen zur Feststellung eventueller Verwandtschaftsunterschiede

2.4.6 Proben

20 Mesozerkarien aus drei verschiedenen Wildschweinen verschiedener Herkunft (Tabelle 2), die lichtmikroskopisch anhand morphologischer bzw. morphometrischer Parameter als *Alaria alata* identifiziert werden konnten, werden für die Untersuchung ausgewählt. Die Mesozerkarien werden gründlich mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und anschließend zur Fixierung in 90-95%igen Ethylalkohol überführt.

Tabelle 2: Übersicht über die Tiere, aus denen *Alaria* spp. Mesozerkarien für die molekularebiologische Identifizierung und die AFLP Analyse gewonnen wurden

WS ¹	Herkunft	Alter (J)	Sex	Gewicht (kg)	Erlegt	Untersucht	Gewebe ²
55	Bernburg, Salzlandkreis Sachsen- Anhalt	1,5	m	54,0	06.11.09	21.04.10	Bauchmuskulatur, Zwischenrippe
57	Görlitz, Sach- sen	1,0	m	30,0	10.11.09	11.11.09	Backe, Zunge
58	Görlitz, Sach- sen	0,5	m	15,0	10.11.09	11.11.09	Backe, Zunge

¹ Wildschwein Nr. ² Gewebe, aus dem die Mesozerkarien isoliert wurden

Tabelle 3: Morphologische und morphometrische Kennzeichen von *Alaria alata* Mesozerkarien

Allgemeine Kennzeichen	Gleicht einer vergrößerten Zerkarie ohne Schwanz. Mund- und Bauchsaugnapf, Pharynx, unpigmentierte Augenflecken, deutlich ausgebildete Penetrationsdrüsen
Körper	4-4,5 mm lang und 1,5-2mm breit
Mundsaugnapf	0,8-1 mm lang und 0,5-0,7 mm breit
Bauchsaugnapf	0,6 mm lang und 0,6-0,7 mm breit, etwas kleiner als der Mundsaugnapf
Protonephridien Formel $2[(n \cdot x + n \cdot x + n \cdot x) + (n \cdot x + n \cdot x)]$ (Odening 1961)	$2[(2 \cdot 7 + 2 \cdot 7 + 2 \cdot 7) + (2 \cdot 7 + 2 \cdot 7)]$

n = Zahl der in ein Nebengefäß 1. Ordnung mündenden Nebengefäße 2. Ordnung (artkonstanter Multiplikationsfaktor) x = die im Durchschnitt artkonstante Zahl von Protonephridien einer zu einem Nebengefäß 2. Ordnung gehörenden Gruppe

2.4.7 Primerdesign

Für die PCR werden auf der Basis der von Olson et al. (2003) identifizierten Gensequenz von *Alaria alata* mithilfe des Vector NTI Advance™ 10 Software Nukleotidsequenzen, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren, bestimmt. Gemäß diesen Sequenzen werden im Anschluss die entsprechenden passenden Primersequenzen (siehe

Tabelle 4) synthetisiert.

2.4.8 DNA Isolation aus einzelnen Larven

Die Extraktion der genomischen DNA aus den einzelnen Isolaten erfolgt mit dem Genomic DNeasy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Germany). Die extrahierte DNA wird in 20 µl TE Puffer eluiert und bis zur Analyse bei 4 C aufbewahrt. Die DNA Konzentrationen werden mit dem NanoDrop™ 2000 (Peqlab, Germany) spectrophotometrisch bestimmt. Im Schnitt können so 100 µg DNA/g Gewebe hochmolekularer genomischer DNA für die spätere Amplifikation in der PCR gewonnen werden

2.4.9 PCR Amplifikation der 18S rDNA Region

Nachdem die genomische DNA wie oben beschrieben extrahiert wurde, kann die molekularebiologische Identifikation der einzelnen Larven mittels PCR erfolgen. Für die Amplifikation der 18S ribosomalen RNA werden die Oligonucleotid Primer DME-F und DME-R verwendet.

Die Sequenzen aller verwendeten Primer, sowie die Zusammensetzung des PCR Mastermix und das gewählte Amplifikationsprogramm sind in

Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Überblick über die in der PCR verwendeten Primer sowie die Zusammensetzung der Mastermix und das verwendete Amplifikationsprogramm

Primer	DME-F (5` - CTTAGCTGCGGGTTCCTGCT -3`) DME-R (5` - CTTAGCTGCGGGTTCCTGCT -3`)			
PCR Mastermix (ReddyMixTM, ABgene®, UK)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Taq Puffer ▪ 1.5 mM MgCl₂ ▪ 0,2 mM jeder dNTP ▪ 75mM Tris-HCl (pH 8,8 at 25°C) ▪ 2.5 µM jedes Olionucleotid Primers ▪ 1.25 U der Taq DNA Polymerase ▪ 50 ng Template DNA <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">} in einem totalen Reaktionsvolumen von 50 µl</div>			
Amplifikationsprogramm	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (sek.)	Zyklen
	Initiale Denaturierung	94	120	
	Denaturierung	94	15	35
	Annealing	58	30	
	Finale Extension	72	300	

Die PCR Produkte werden anschließend in 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter dem UV-Transilluminator visualisiert. Die Detektion von *Alaria alata* Isolaten erfolgt anhand einer einzelnen Bande bei 303 bp

2.4.10 Genotypisierung mittels Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)-Reaktion

Die AFLP-Analyse der *Alaria alata* Isolate wird auf der Basis des Protokolls von Mikkonen et al. (2004) mit geringfügigen Modifikationen durchgeführt. Die DNS wird simultan unter Einsatz von je 15U der Restriktionsenzyme HindIII and Tru1I (Fermentas, Germany) in einem Restriktionsendonuklease Puffer mit bovinem Serum Albumin bei 37°C für eine Stunde verdaut. Im Anschluss werden enzymespezifische Adapter mit 0,95 U T4 DNA Ligase (Fermentas, Germany) für 2 h bei 37°C an den Enden der DNA Stränge ligiert. Es folgten zwei PCR Amplifikationen, bei denen spezifische und unspezifische Oligonukleotidprimer verwendet werden.

Nach der zweiten Amplifikation werden die markierten Fragmente mit Hilfe einer Elektrophorese in 12.5%igem Sodium Dodecylsulfate (SDS)-Gel (ExcelGel[®] DNA Analysis Kit, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) auf einem Multiphor[®] II Apparat (Amersham Biosciences) aufgetrennt und anschließend visualisiert (PlusOne DNA Silver Staining Kit, Amersham Biosciences) und fotografiert (Chemilmager[®] 4400, Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Alle Daten werden mit der AlphaEase[®] Software Version 5.5 (Alpha Innotech) gesichert und anschließend die Fragment Analyse mittels der Phoretix 1D Advanced[®] Version 5.20 und Phoretix 1D Database[®] Version 2.00 Software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) durchgeführt. Dabei werden ausschließlich AFLP Fragmente mit einer Größe von 34–501 bp ausgewertet (XII DNA-Sizer, Peqlab, Erlangen, Germany).

3 Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.1.1 Meilenstein „Methodik“

3.1.1.1 Untersuchungen mittels TIM

Bis zum 31.07.2010 wurden 940 Einzelproben aus 54 Wildschweinen mithilfe der TIM untersucht. Die Proben wurden dabei von verschiedenen anatomisch definierten Probennahmestellen (s. 2.2.2) entnommen und gemäß der unter 2.1.3 beschriebenen Arbeitsanweisung untersucht. Die Probengröße der untersuchten Probenansätze variierte dabei, aufgrund der unterschiedlichen Verfügbarkeit der einzelnen Gewebeproben zwischen 11,6 und 125 g. 40 Wildschweine wurden von den Kooperationspartnern bzw. kooperierenden amtlichen Untersuchungsstellen aufgrund eines positiven DME Befunds als untauglich eingestuft und nach Absprache mit dem Verfügungsberechtigten zur Verfügung gestellt. Weitere vier Tiere wurden aus anderen Gründen als untauglich beurteilt und anschließend dem Institut für Lebensmittelhygiene überstellt. 10 Tiere, die aufgrund von Unfällen oder aus anderen Gründen zu Tode gekommen waren, wurden direkt an das Institut für Lebensmittelhygiene überstellt.

Durch den Einsatz der TIM konnte in 28 Fällen (70%) der durch das Veterinäramt gestellte positive Erstbefund bestätigt werden; bei 12 Tieren (30%) war eine Bestätigung nicht möglich obwohl die Muskulatur der betreffenden Tiere nach der Zerlegung nahezu komplett verdaut wurde. Auch die 14 verbleibenden Tiere zeigten ein negatives DME Ergebnis. Die Zahl der gefundenen Larven variierte stark und lag zwischen 1 und 48 DME/Einzelprobe (0,01 bis 17,58 DME/100g). Im Mittel wurden 1,06 DME/100g gefunden. Der Median lag bei 0,03, die Standardabweichung bei 3,08 DME/100g.

Bereits bei den ersten Untersuchungen zeigte sich, dass die Larven bei der Untersuchung mit TIM häufig absterben und im Zuge des fortschreitenden Einflusses der Verdauungsflüssigkeit ihre charakteristische Form verlieren. Um diese Beobachtung zu verifizieren wurde vitale Mesozerkarien-Isolate HCl/Pepsin Konzentrationen, wie sie in der Referenzmethode eingesetzt werden, ausgesetzt. Die Larven verloren in vielen Fällen bereits nach Minuten ihre Motilität und die charakteristischen inneren Strukturen begannen sich aufzulösen. Nach 15 Minuten Einwirkzeit kugelten sich die Mesozerkarien deutlich ab und nach 90 Minuten begann die schrittweise Zersetzung (Abbildung 3).

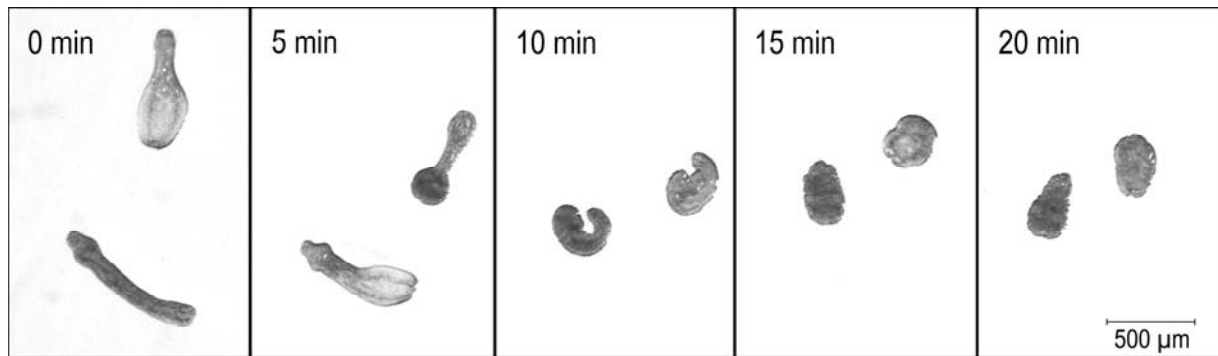


Abbildung 3: *Alaria* spp. Mesozerkarien in direktem Kontakt mit 5 ml HCl/Pepsin Verdauungsflüssigkeit, die aus einem Untersuchungsansatz zur Durchführung des Referenzverfahrens zur künstlichen Verdauung von Sammelproben gem. VO (EG) Nr. 2075/2005 entnommen wurde.

Beachtenswert ist zudem, dass der Einfluss der Verdauungsflüssigkeit ohne zusätzliche Wärme oder mechanisches Rühren erfolgte, so dass unter Praxisbedingungen noch eher mit einer Zersetzung zu rechnen ist. Weiterhin erbrachten die stereomikroskopischen Kontrollen der eingesetzten Siebe mit 180 Mikron Maschenweite in einigen Fällen den Beleg, dass die Larven die Maschen nicht immer einwandfrei passieren können bzw. sich in den Maschen verfangen (Abbildung 4).

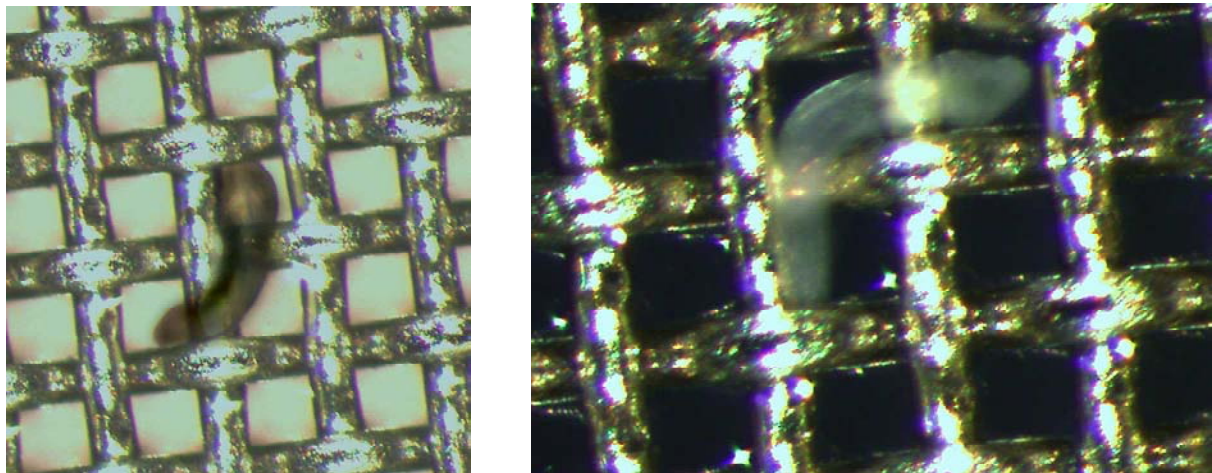


Abbildung 4: Stereomikroskopische Aufnahmen von Analysesiebenen mit 180 Mikron Maschenweite, die im Magnetührverfahren zur Diagnostik von *Alaria alata* Mesozerkarien eingesetzt wurden und auf denen nach der Untersuchung noch einzelne vitale Mesozerkarien befinden.

3.1.1.2 Untersuchungen mittels LDM

Zielführend für die Entwicklung dieser Methode war zum einen die in der Literatur beschriebene hohe Affinität der Parasiten zu Fettgewebe (siehe Möhl et al. 2009) zum anderen sollte eine möglichst schonende Verdauungsmethode etabliert werden um die Integrität der Parasiten weitestgehend zu erhalten. Um die Fettverdauung im Dünndarm von Säugetieren zu simulieren wurden Pankreatin[®] und Gallensäure mit und ohne HCl/Pepsin Zusatz verwendet.

Insgesamt wurden 89 Einzelproben aus 12 Tieren mit dieser Methode untersucht. In 75 Einzelproben (84,3%), bestehend aus Körperfett, konnte der Duncker'sche Muskelegel nachgewiesen werden. Die Zahl der pro Probe isolierten Mesozerkarien lag zwischen 1 und 14 DME/Einzelprobe (0,01 bis 2,05 DME/100g). Im Mittel wurden 0,58 DME/100g gefunden. Der Median lag bei 0,32, die Standardabweichung bei 0,63 DME/100g.

Obwohl mithilfe der Pankreatin[®]/Gallensäure Verdauung nur 10 bis maximal 15% des eingesetzten Probenmaterials verdaut werden konnten, war die Zahl der pro Einheit Probenmaterial isolierten Larven gegenüber dem Magnetrührverfahren in einigen Fällen erhöht. Eine stereomikroskopische Kontrolle zeigte zudem, dass sich die Larven offenbar aktiv aus dem unverdauten Probenmaterial in die umgebende Flüssigkeit bewegten. Gleichzeitig erschienen die isolierten Larven, im Vergleich zu Mesozerkarien welche mittels HCl/Pepsin isoliert worden waren, sehr vital und ließen keinerlei Anzeichen eines Integritätsverlustes erkennen. Obwohl somit eine wichtige Zielstellung bei der Entwicklung eines geeigneten Nachweisverfahrens für den Duncker'schen Muskelegels erreicht wurde, zeigte die Methode bereits am Anfang auch deutliche Schwächen. Diese waren neben der beschriebenen mangelhaften Verdauleistung vor allem

- die Erforderlichkeit der Verwendung eines Siebes (180 µm) mit möglichen Verlusten.
- ein hoher Anteil an Detritus aus der Verdauung, der die lichtmikroskopische Diagnostik erheblich erschwert.

Außer der höheren Überlebensrate und Vitalität der Larven konnten gegenüber der TIM keine deutlichen Vorteile festgestellt werden. Im Vergleich mit der TIM, mit der durchschnittlich 1,06 DME aus 100g Probenmaterial isoliert werden konnten, konnten mithilfe der LDM nur 0,58 Larven/100 g Probenmaterial detektiert werden.

3.1.1.3 Untersuchungen mittels AMT

Die intensivierete Studie der relevanten Literatur erbrachte an mehreren Stellen Hinweise auf eine Affinität der Entwicklungsstadien von *Alaria* spp. zu Wasser und anderen Flüssigkeiten wie Ringerlösung oder NaCl-Lösung (Bugge 1942, Pearson 1956, Freeman 1976). Die Autoren berichten, dass der Duncker'sche Muskelegel aus toten Tieren bzw. Fleischteilen, die im Wasser liegen, auswandert bzw. aus ihnen „herausgewaschen“ werden kann.

Basierend auf den eigenen Beobachtungen bei der Entwicklung der Lipidverdauung und den Hinweisen in der Literatur wurde ein modifiziertes Larvenauswanderverfahren (**A**laria **M**eso-cercariae **M**igration **T**echnique, AMT) entwickelt und erstmals für den Nachweis von Trematodenlarven verwendet.

Das ursprüngliche Larvenauswanderungsverfahren nach Baermann-Wetzel, ist ein koproskopisches Nachweisverfahren für den Nachweis von parasitären Entwicklungsstadien viviparer Magen-Darm-Parasiten. Nach gesonderter Anzucht ist auch der Nachweis von oviparen Parasiten möglich. Das Verfahren basiert auf dem Bestreben der Larven aus dem Untersuchungsmaterial in die umgebende Flüssigkeit auszuwandern. Dabei ist ihnen eine seitwärtsschlängelnde Fortbewegung möglich, jedoch kein Schwimmen, weswegen sie in freier Flüssigkeit absinken. Das Verfahren ist seit der Erstbeschreibung durch Baermann (1917) mehrfach modifiziert worden und wird für den Nachweis von Nematodenlarven (nach vorhergegangener Anzucht), *Haemonchus contortus*, Hakenwürmern und *Protostrongylus* spp. empfohlen.

Bis zum 31.07.2010 wurden 1053 Einzelproben aus 54 Wildschweinen mithilfe der AMT untersucht. Die Probengröße der einzelnen Proben variierte zwischen 10 und 60g. 897 Einzelproben aus 46 Tieren (85.2%) konnten als positiv identifiziert werden. Die Anzahl der in den Geweben der positiven Tiere detektierten Larven lag zwischen 1 und 149 Individuen, was einer Larvenzahl von 0,01 bis 98,61 DME/100 g Gewebe entspricht. Im Mittel wurden 6,19 Larven/100g Gewebe gefunden, der Median lag bei 0,65, die Standardabweichung bei 15,92 DME/100g.

Um die Effektivität der AMT gegenüber der TIM zu ermitteln, wurden 186 grob zerkleinerte und gut durchmischte Einzelproben von 18 Wildschweinen parallel mit beiden Methoden untersucht. Mit dem TIM konnten 27 positive Proben identifiziert werden. Die Anzahl der gefundenen Larven lag zwischen 0,6 und 224 DMS/100g. Im Mittel konnten 4,4 Larven/100g isoliert werden, die Standardabweichung lag bei 20,5 DME/100g. Mit der AMT wurden 65 positive Proben gefunden. Die Anzahl der gefundenen Larven lag zwischen 0,2 und 193 DMS/100g. Im Mittel konnten 9,6 Larven/100g isoliert werden, die Standardabweichung lag bei 28,8 DME/100g.

Wie Tabelle 5 zeigt, war es möglich, 38 positive Proben, die bei der alleinigen Anwendung des MRV unentdeckt geblieben waren, mittels AMT als DME-positiv identifiziert werden. Gleichzeitig erfolgte die Bestätigung aller positiven Proben aus der TIM mittels AMT. Dies bedeutet, dass 58,5% der positiven Proben bei alleiniger Anwendung des Magnetrührverfahrens als falsch negativ beurteilt worden wären.

Tabelle 5: Effektivität des MRV gegenüber der AMT bei der Identifikation von *A. alata* Mesozerkarien in Gewebeproben

	AMT +	AMT -	Total
TIM +	27	0	27
TIM -	38	121	159
Total	65	121	186

TIM: Official *Trichinella* inspection method; **AMT:** *Alaria alata* mesocercariae migration technique; +: positives DME Ergebnis; -: negatives DME Ergebnis

Die AMT weist gegenüber der Referenzmethode eine um etwa 60 % gesteigerte Sensitivität auf. Die Methode zeichnet sich neben ihrer einfachen Handhabung vor allem durch ihre Robustheit und Kosteneffektivität aus. Weiterhin werden keinerlei Chemikalien eingesetzt, die die Vitalität der Parasiten beeinflussen könnten. Um die Methode weiter zu optimieren wurden Versuchsreihen zur Anwendung verschiedener Medien, zu einem unterschiedlichen Zerkleinerungsgrad des Probenmaterials und zu unterschiedlichen Auswanderungszeiten durchgeführt.

Wie Tabelle 6 zeigt, hat sich der Einsatz von Leitungswasser als Auswanderungsmedium in der AMT bewährt. In drei verschiedenen Untersuchungsdurchgängen bei denen Gewebe stark infizierter Tiere, welches zuvor manuell zerkleinert und gründlich gemischt wurde, zur Untersuchung mittels AMT eingesetzt wurde, konnten so im Mittel 48,7 Larven/100g detektiert werden. Durch den Einsatz von Ringerlösung konnten im Mittel 6, durch Ringer-Lactat Lösung 5 und durch physiologische Kochsalzlösung bzw. 5%ige Glucoselösung 2 Larven/100g Gewebe detektiert werden.

Tabelle 6: Untersuchung verschiedener Medien zur Larvenauswanderung

US Nr.	Datum	Material (ges. 30 g)	Medium					Isolierte Mesozerkarien
			LW	R	RL	NC	GL	
1	11.11.2009	Zunge WS	96	6	5	4	2	
2	11.11.2009	Bauch, <i>Glandula parotis</i> WS	12	3	3	1	3	
3	11.11.2009	Backe, Zwischenrippe, Masseter WS	38	6	7	2	1	

LW: Leitungswasser, R: Ringerlösung, RL: Ringerlactatlösung, NC: physiologische Kochsalzlösung, GL: Glucoselösung 5%, WS: Wildschwein

Tabelle 7 zeigt, dass unter den oben beschriebenen Bedingungen, ein großer Teil der Larven innerhalb der ersten halben Stunde aus dem Probenmaterial in die umgebende Verdauungsflüssigkeit auswandert. Nach weiteren 30, 60 und 210 Minuten konnten in einigen Fällen nur noch vereinzelte Larven in der Verdauungsflüssigkeit identifiziert werden. Eine Reduktion der Auswanderzeit ist demzufolge durchaus denkbar. Gleichzeitig würde so der praktische Wert der Methode im Hinblick auf den Einsatz in der Routinediagnostik gesteigert werden. Für eine endgültige Beurteilung sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig.

Tabelle 7: Untersuchungen zur Optimierung der Auswanderzeit (0,5-4 h)

US Nr.	Datum	Material (je 30 g)	Auswanderzeit			
			0,5 h	1 h	1,5 h	4 h
1	20.10.2009	Muskulatur vom Dachs	7	2	Ø	4
2	20.10.2009	Muskulatur vom Dachs	26	1	Ø	4
3	20.10.2009	Muskulatur vom Dachs	5	Ø	Ø	Ø
4	20.10.2009	Muskulatur vom Dachs	Ø	2	Ø	1
5	20.10.2009	Muskulatur vom Dachs	6	3	Ø	5

Isolierte Mesozerkarien

Tabelle 8 zeigt, dass der Auswahl des Zerkleinerungsgrades offenbar eine untergeordnete Bedeutung zukommt. Das Probenmaterial sollte aber in jedem Fall manuell zerkleinert werden, da ein zu hoher Zerkleinerungsgrad, wie er bei der mechanischen Zerkleinerung im Mixer auftritt, das zu untersuchende Sediment z. T. deutlich trübt und somit eine korrekte Durchmusterung behindern kann. Ebenso eignet sich unzerkleinertes Fleisch für den Einsatz in der AMT weniger, da die Larven aus einem massiven Fleischblock offensichtlich schlechter auswandern.

Tabelle 8: Untersuchungen zur Optimierung des Zerkleinerungsgrades

US Nr.	Datum	Material (je 30 g)	Zerkleinerungsgrad (cm)			
			0,2-0,5	1-1,5	2-2,5	n.z.
1	15.02.2010	Kehlkopf WS	51	83	64	29
2	15.02.2010	Bauch WS	10	24	17	25
3	15.02.2010	Masseter WS	23	3	12	9
4	15.02.2010	Backe WS	24	14	41	41
5	15.02.2010	Schulter WS	1	3	1	1
6	15.02.2010	Bauchfell WS	26	81	41	39
7	15.02.2010	Zwischenrippe WS	21	16	15	2
8	15.02.2010	Rücken WS	2	4	1	1
9	15.02.2010	Bauch WS	94	22	3	7
10	15.02.2010	Bauch WS	110	70	5	0

Isolierte Mesozerkarien

WS: Wildschwein n. z.: nicht zerkleinert

3.1.2 Meilenstein „Prädilektionsstellen“

Parallel zu den Untersuchungen zur Methodik wurde das Verteilungsmuster der Parasiten im Wildschwein auf der Basis von 1.377 Einzelproben aus 35 DME-positiven Wildschweinen untersucht. Es zeigte sich, dass sich die Parasiten offenbar sehr heterogen im Körper der paratenischen Wirte verteilen und dass sich das Verteilungsmuster grundlegend von dem von *Trichinella* spp. unterscheidet (s. Abbildung 5). Gleichzeitig wurde deutlich, dass DME Lokalisationen mit hohen Anteilen von inter- und intramuskulärem Fett- und Bindegewebe sowie Knorpel- und Drüsengewebe bevorzugt.

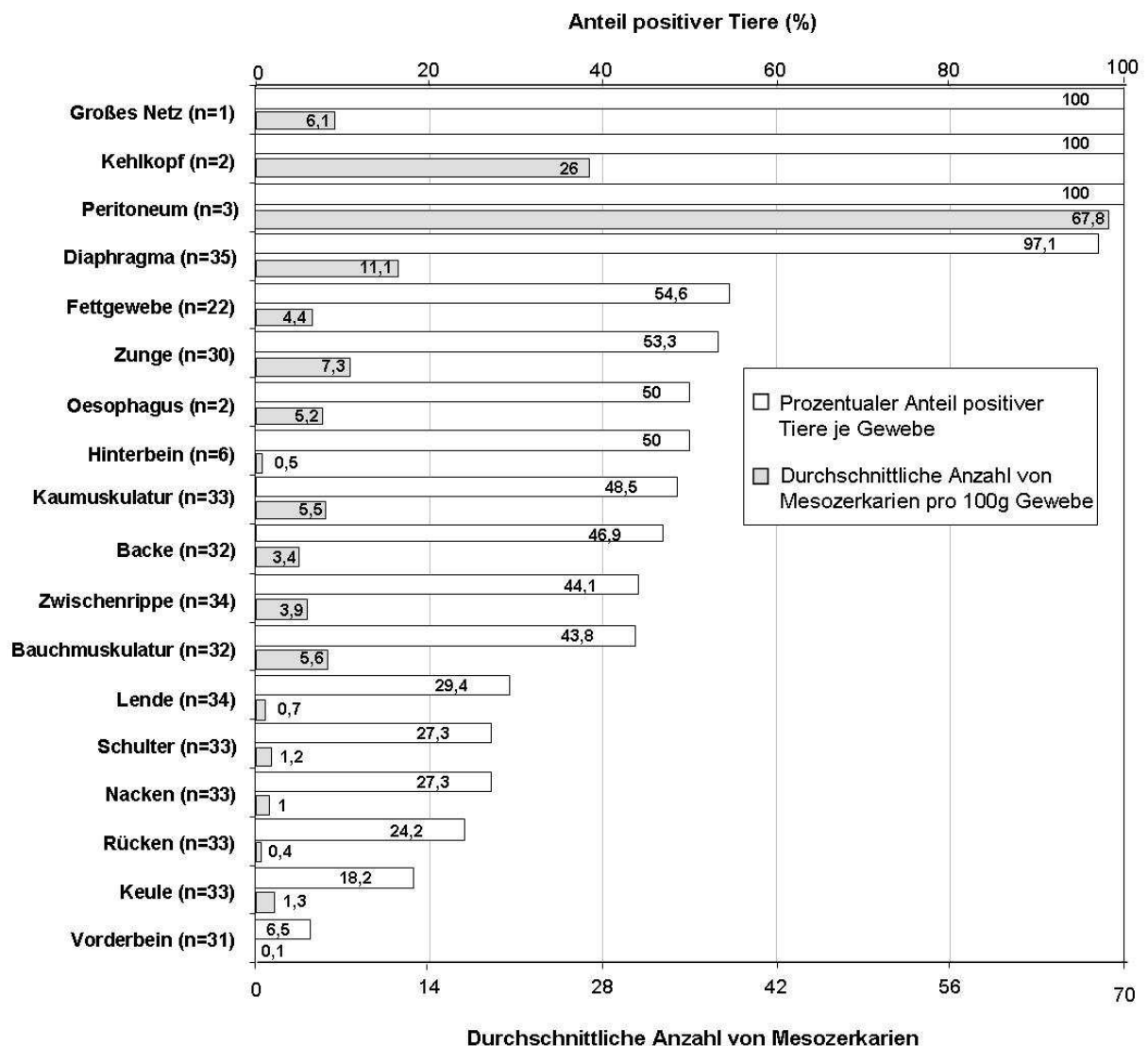


Abbildung 5: Durchschnittliche Anzahl von *A. alata* Mesozerkarien pro 100 g Gewebe (untere x-Achse, graue Balken) in verschiedenen Gewebeproben (n: Anzahl der Proben) von 35 Wildschweinen und Anteil der Tiere mit einem positiven Ergebnis in diesem Gewebe/dieser Gewebeprobe (obere x-Achse, weiße Balken) nach Untersuchung mittels Referenzverfahren (TIM, 739 Proben), Lipidverdauung (LDM, 89 Proben) und mod. Larvenauswanderverfahren (AMT, 549 Proben).

3.1.3 Meilenstein „Prävalenz“

3.1.3.1 Prävalenz I

Wie Tabelle 9 zeigt, wurden dem Institut für Lebensmittelhygiene insgesamt 93 Wildschweinkarkassen zur Untersuchung überlassen (Stand 31.07.2010). Bis auf sechs Tiere stammten alle Wildschweine aus den neuen Bundesländern, namentlich Sachsen, Sachsen-Anhalt, Brandenburg und Thüringen.

Tabelle 9: An das Institut für Lebensmittelhygiene überstellte Wildschweine

Datum	Interne Bez.	Altersklasse ¹	Gewicht (kg)	Sex	VB/US	Herkunft
27.10.2008	WS 1	1	21	männlich	p/p	Uckermark
08.11.2008	WS 2	1	25	weiblich	n. u./n	Brandenburg
08.11.2008	WS 3	1	25	weiblich	n. u./n	Brandenburg
14.11.2008	WS 4	2	45	männlich	p/p	Uckermark
15.11.2008	WS 5	1	21	männlich	p/p	Uckermark
27.11.2008	WS 6	1	80	männlich	p/p	Uckermark
20.11.2008	WS 7	2	70	weiblich	p/p	Uckermark
20.11.2008	WS 8	0	10	weiblich	p/p	Uckermark
20.11.2008	WS 9	0	15	weiblich	p/p	Uckermark
09.01.2009	WS 10	2	50	männlich	p/p	Dessau
13.01.2009	WS 11	1	18	weiblich	p/p	Brandenburg
16.01.2009	WS 12	1	21	männlich	p/p	Dessau
03.02.2009	WS 13	0	10	weiblich	n/n	Delitzsch
09.02.2009	WS 14	k. A.	48	männlich	p/p	Dessau
13.02.2009	WS 15	k. A.	15	k. A.	p/n	Bernburg
13.02.2009	WS 16	k. A.	20	k. A.	p/n	Bernburg
20.02.2009	WS 17	1	40	männlich	p/p	Bernburg
20.02.2009	WS 18	1	43	männlich	p/p	Bernburg
04.03.2009	WS 19	1	31	männlich	p/p	Brandenburg
11.03.2009	WS 20	2	67	weiblich	p/p	Brandenburg
26.03.2009	WS 21	1	26	männlich	p/p	Uckermark

Datum	Interne Bez.	Altersklasse ¹	Gewicht (kg)	Sex	VB/US	Herkunft
26.03.2009	WS 22	1	43	weiblich	p/p	Uckermark
14.05.2009	WS 23	1	23	weiblich	p/p	Uckermark
14.05.2009	WS 24	1	21	weiblich	p/p	Uckermark
19.05.2009	WS 25	1	29	weiblich	p/n	Uckermark
22.05.2009	WS 26	1	31	männlich	p/p	Brandenburg
22.06.2009	WS 27	1	62	männlich	p/p	Klitten
22.06.2009	WS 28	1	50	männlich	n/n	Daubitz-Teicha
22.06.2009	WS 29	0	5	männlich	n. u./n	Neuliebel
22.06.2009	WS 30	0	5	männlich	n. u./n	Neuliebel
22.06.2009	WS 31	0	5	männlich	n. u./n	Neuliebel
22.06.2009	WS 32	0	5	weiblich	n. u./n	Neuliebel
22.06.2009	WS 33	0	4	männlich	n. u./n	Neuliebel
22.06.2009	WS 34	1	33	weiblich	n/n	Klitten
03.07.2009	WS 35	1	25	weiblich	n/n	Brandenburg
06.07.2009	WS 36	1	45	männlich	p/p	Uckermark
09.07.2009	WS 37	1	29	weiblich	p/p	Dessau
22.07.2009	WS 38	1	38	männlich	p/p	Görlitz
24.07.2009	WS 39	1	31	weiblich	p/p	Görlitz
24.07.2009	WS 40	2	65	weiblich	p/p	Görlitz
11.08.2009	WS 41	1	37	männlich	p/p	Brandenburg
11.08.2009	WS 42	0	17	weiblich	p/p	Brandenburg
11.08.2009	WS 43	1	44	männlich	p/p	Brandenburg
11.08.2009	WS 44	0	8	männlich	n. u./n	Görlitz
11.08.2009	WS 45	1	25	weiblich	p/p	Brandenburg
12.08.2009	WS 46	1	42	männlich	p/p	Görlitz
12.08.2009	WS 47	2	50	weiblich	p/p	Görlitz
12.08.2009	WS 48	0	7	männlich	n. u./n	Görlitz
12.08.2009	WS 49	0	7	weiblich	n. u./n	Görlitz
26.08.2009	WS 50	2	45	männlich	p/p	Görlitz

Datum	Interne Bez.	Altersklasse ¹	Gewicht (kg)	Sex	VB	Herkunft
15.09.2009	WS 51	1	60	männlich	p/p	Uckermark
05.10.2009	WS 52	k. A.	30	k. A.	p/p	Bernburg
13.10.2009	WS 53	k. A.	30	k. A.	p/p	Bernburg
20.10.2009	WS 54	1	48	männlich	p/p	Brandenburg
06.11.2009	WS 55	1	54	männlich	p/p	Brandenburg
11.11.2009	WS 57	1	30	männlich	p/p	Görlitz
11.11.2009	WS 58	1	15	männlich	p/p	Görlitz
22.01.2010	WS 59	0	18	weiblich	p/p	Görlitz
26.01.2010	WS 60	k. A.	12	k. A.	p/p	Luckenwalde
28.01.2010	WS 61	k. A.	17,4	k. A.	p/p	Mölln/Lauenburg
28.01.2010	WS 62	k. A.	21,4	k. A.	p/p	Mölln/Lauenburg
28.01.2010	WS 63	k. A.	22,4	k. A.	p/p	Mölln/Lauenburg
28.01.2010	WS 64	k. A.	45,5	k. A.	p/p	Mölln/Lauenburg
28.01.2010	WS 65	k. A.	25,4	k. A.	p/p	Mölln/Lauenburg
28.01.2010	WS 66	k. A.	16,3	k. A.	p/p	Mölln/Lauenburg
28.01.2010	WS 67	0	19,2	männlich	p/p	Mölln/Lauenburg
02.02.2010	WS 68	0	28,5	männlich	p/p	Brandenburg
11.02.2010	WS 69	k. A.	k. A.	k. A.	p/p	Bernburg
11.02.2010	WS 70	k. A.	k. A.	k. A.	p/p	Bernburg
09.03.2010	WS 71	0	9	weiblich	p/p	Bernburg
23.03.2010	WS 72	0	10	weiblich	n. u./p	Bernburg
25.03.2010	WS 73	0	8	weiblich	p/p	Salzlandkreis
30.03.2010	WS 74	k. A.	35	weiblich	p/p	Brandenburg
30.03.2010	WS 75	k. A.	30	weiblich	p/p	Brandenburg
20.04.2010	WS 76	k. A.	14	weiblich	p/p	Bernburg
23.04.2010	WS 77	1	25	männlich	p/p	Cottbus
23.04.2010	WS 78	1	23	weiblich	p/p	Cottbus
27.04.2010	WS 79	k. A.	25	k. A.	p/p	Brandenburg
30.04.2010	WS 80	k. A.	48	k. A.	p/p	Brandenburg

Datum	Interne Bez.	Altersklasse ¹	Gewicht (kg)	Sex	VB	Herkunft
05.05.2010	WS 81	1	47	männlich	p/p	Brandenburg
05.05.2010	WS 82	1	18	weiblich	p/p	Brandenburg
10.05.2010	WS 83	1	35	männlich	p/p	Brandenburg
10.05.2010	WS 84	1	k. A.	weiblich	p/p	Brandenburg
10.05.2010	WS 85	1	k. A.	weiblich	n. u./n	Brandenburg
31.05.2010	WS 86	k. A.	k. A.	k. A.	n/n	Brandenburg
31.05.2010	WS 87	1	k. A.	männlich	n/n	Brandenburg
02.06.2010	WS 88	2	35	männlich	p/p	Uckermark
15.06.2010	WS 89	1	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis
22.06.2010	WS 90	1	40,0	männlich	p/p	Brandenburg
23.06.2010	WS 91	0	55,0	männlich	p/p	Brandenburg
28.06.2010	WS 92	k. A.	38,0	männlich	p/p	Uckermark
28.06.2010	WS 93	k. A.	64,0	männlich	p/p	Uckermark

WS: Wildschwein; VB: Vorbericht DME; k. A.: keine Angabe; n. u.: nicht untersucht; p: positiv; n: negativ; ¹0: < 1Jahr; 1:> 1 Jahr, 2: >2 Jahre

Die Tabelle zeigt, dass Wildschweine aller Alters- und Gewichtsklassen gleichermaßen betroffen sind. Ebenso hat das Geschlecht offenbar keinen Einfluss auf die Infektionshäufigkeit. Es fällt jedoch auf, dass alle Tiere aus Gebieten stammen, die durch ausgedehnte Seen- (z. B. Stadt und Kreis Brandenburg, Uckermark, Mülln) oder Flusslandschaften (z. B. Salzlandkreis, Cottbus, Görlitz) gekennzeichnet sind. Verbunden mit dem zahlreichen Auftreten geeigneter Endwirte kann hier ein durch das Vorhandensein entsprechender Habitate für die Zwischenwirte ein ausgedehnter Infektionszyklus auch unter den paratenischen Wirten aufrechterhalten werden. Dies wird auch durch zahlreiche Funde verschiedener *Alaria alata* Entwicklungsstadien in potentiellen Endwirten aus den betroffenen Gebieten belegt (Tabelle 10). Besonders Waschbären und Dachse aus Brandenburg scheinen häufig Träger der Parasiten zu sein. In Wildgeflügel konnte der Parasit hingegen nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 10: Nachweis von *Alaria alata* Entwicklungsstadien in verschiedenen Wildtieren

US-Datum	Wildart	Gewicht (kg)	Geschlecht	Herkunft	Befund
16.10.2008	Wildente	?	?	Brandenburg	neg.
16.10.2008	Wildente	?	?	Brandenburg	neg.
21.09.2009	Wildente	?	?	Brandenburg	neg.
03.04.2009	Marderhund	3	w	Brandenburg	pos.
21.09.2009	Marderhund	0,8	?	Brandenburg	neg.
15.07.2010	Marderhund	?	m	Glesien	neg.
24.06.2009	Igel	2	w	Brandenburg	neg.
18.03.2010	Igel	?	w	Brandenburg	neg.
26.02.2009	Dachs	10	m	Brandenburg	pos.
26.03.2009	Dachs	10	m	Brandenburg	pos.
26.03.2009	Dachs	10	m	Brandenburg	pos.
02.04.2009	Dachs	11	w	Brandenburg	pos.
14.05.2009	Dachs	10	w	Rügen	pos.
14.10.2009	Dachs	5	?	Brandenburg	pos.
06.11.2009	Dachs	?	?	Brandenburg	pos.
04.12.2009	Dachs	8	w	Brandenburg	neg.
18.03.2010	Dachs	?	?	Brandenburg	neg.
27.04.2010	Dachs	?	?	Brandenburg	neg.
19.04.2010	Waschbär	?	?	Brandenburg	pos.
17.05.2010	Waschbär	?	?	Brandenburg	pos.
31.05.2010	Waschbär	?	?	Brandenburg	pos.
30.06.2010	Waschbär	?	?	Brandenburg	pos.
28.07.2010	Waschbär	?	m	Brandenburg	pos.
28.07.2010	Waschbär	?	w	Brandenburg	pos.
28.07.2010	Waschbär	?	k	Brandenburg	pos.
28.07.2010	Waschbär	?	k	Brandenburg	pos.
16.08.2010	Waschbär	?	w	Brandenburg	pos.
16.08.2010	Waschbär	?	k	Brandenburg	pos.
16.08.2010	Waschbär	?	k	Brandenburg	pos.

3.1.3.2 Prävalenz II

Im Untersuchungszeitraum 2008 haben 143 Kreise die Erhebungsbögen zur Untersuchung von Schwarzwild sowie den DME Funden korrekt ausgefüllt und an die Kooperationspartner zurückgesandt. 2009 sank die Zahl der rückmeldenden Kreise um rund 25% auf 107. Insgesamt beteiligt sich somit im Jahre 2008 46,3% und im Jahre 2009 32,8% der bundesdeutschen Veterinärämter.

Hervorzuheben ist hier die sehr hohe Rückmeldequote aus den Bundesländern Thüringen, Sachsen-Anhalt und Brandenburg. So konnte in Brandenburg und Sachsen-Anhalt in beiden Jahren eine 100%ige Beteiligung der ansässigen Veterinärämter an der Umfrage verzeichnet werden. In Thüringen lag die Beteiligung in beiden Jahren bei über 60%. In diesen drei Bundesländern wurde die Umfrage durch die entsprechenden Ministerien begleitet. Auch in Mecklenburg-Vorpommern konnte eine gute Beteiligung registriert werden. Hier meldeten 2008 11 von 18 Kreisen (61,1%) ihre Befunde. 2009 sank die Beteiligung jedoch auf fünf Kreise (27,8%). Keine Daten liegen bislang aus dem Saarland und aus Bremen vor.

Tabelle 11: Umfragerückmeldungen zu positiven DME-Befunden aus den Bundesländern in den Jahren 2008 und 2009

BL	Kreise	Kreise mit Rückmeldung				Anzahl	
		2008		2009		mit DME-Funden	
		absolut	%	absolut	%	2008	2009
BB	18	18	100,0	18	100,0	8	7
BE	1	1	100,0	0	0,0	0	0
BW	44	6	13,6	3	6,8	0	0
BY	96	23	24,0	18	18,8	0	0
HB	2	0	0,0	0	0,0	0	0
HE	26	12	46,2	6	23,1	0	0
HH	1	1	100,0	1	100,0	0	0
MV	18	11	61,1	5	27,8	10	6
NI	46	18	39,1	12	26,1	0	1
NW	54	13	24,1	8	14,8	1	1
RP	36	2	5,6	2	5,6	0	0
SH	15	4	26,7	2	13,3	1	1
SL	6	0	0,0	0	0,0	0	0
SN	13	4	30,8	3	23,1	1	1
ST	14	14	100,0	14	100,0	3	3
TH	23	16	69,6	15	65,2	0	0

Stand per 09.08.2010

Kreise mit Funden von DME bei der Schwarzwilduntersuchung stellten ihre Untersuchungszahlen als Überblick und sofern vorhanden auch im Einzelnen mittels Einzelerhebungsbogen zur Verfügung. Die Mitteilungen der Kreise enthielten teilweise keine Angaben zur Durchführung der Untersuchung mittels Sammelansatz oder als Einzeluntersuchung. Alle Angaben der 24 Kreise, die für 2008 Funde von DME bei der Schwarzwilduntersuchung gemeldet hatten, sind in der Tabelle 12 zusammengefasst. Es zeigt sich, dass bis auf den Kreis Lübeck Stadt und Coesfeld offenbar nur Kreise in den neuen Bundesländern betroffen sind. Überdurchschnittlich häufig sind hier die Bundesländer Mecklenburg Vorpommern (90% der meldenden Kreise mit positiven DME Befunden) und Brandenburg (44,4% der meldenden Kreise mit positiven DME Befunden) betroffen.

Tabelle 12: Überblick zur Befundsituation in den Kreisen mit DME-Funden

BL	Landkreis	US	EA	EA	SA	SA	SA	DME Funde	
		SW		pos.		pos.	ETF	absolut	anteilig (%)
SN	Görlitz	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	5	
SH	Lübeck, Stadt	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	1	
NW	Coesfeld	662	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	19	2,87
MV	Neubrandenburg, Stadt	36	0	0	2	1	0	1	2,78
BB	Brandenburg, Stadt	628	628	14	0	0	0	14	2,23
MV	Rostock, Stadt	1.187	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	25	2,11
ST	Salzlandkreis	1.072	30	8	1.042	15	12	20	1,87
MV	Rügen	1.329	0	0	0	21	0	21	1,58
ST	Dessau-Roßlau, Stadt1	1.398	1.022	3	349	7	3	10	0,72
ST	Stendal	417	75	0	342	1	1	1	0,24
MV	Bad Doberan	997	10	0	987	3	2	3	0,30
BB	Frankfurt (Oder), Stadt	573	0	0	573	1	1	1	0,18
MV	Ludwigslust	5.189	0	0	5.189	7	1	7	0,14
MV	Ostvorpommern	4.283	0	0	4.283	5	0	5	0,12
BB	Ostprignitz-Ruppin	3.182	0	0	3.182	1	3	3	0,09
MV	Mecklenburg-Strelitz	3.352	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	3	0,09
BB	Teltow-Fläming	3.556	0	0	3.556	3	1	3	0,08
MV	Nordvorpommern	4.763	0	0	4.763	0	0	4	0,08
MV	Uecker-Randow	3.641	0	0	3.641	0	0	3	0,08
BB	Dahme-Spreewald	3.748	544	2	3.204	0	0	2	0,05
BB	Barnim	3.805	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	2	0,05
MV	Güstrow	4.261	0	0	0	0	0	2	0,05
BB	Potsdam-Mittelmark	6.828	0	0	0	0	0	2	0,03
BB	Uckermark	5.262	0	0	0	0	0	1	0,02

BL: Bundesland; US: Anzahl der untersuchten Stücke Schwarzwild; EA: durchgeführte Einzeluntersuchungen; EA pos.: im Einzelansatz als positiv identifizierte Stücke; SA: durchgeführte Sammeluntersuchungen; SA pos.: positiver Sammelansatz; SA ETF: Identifikation positiver Stücke aus einem Sammelansatz; k. A.: keine Angabe

Eine vergleichbare Situation zeigt sich 2009; auch hier sind bis auf wenige Ausnahmen nur Kreise in den neuen Bundesländern betroffen. Alle Angaben der 20 Kreise, die für 2009 Funde von DME bei der Schwarzwilduntersuchung gemeldet hatten, wurden in der Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Überblick zur Befundsituation in den Kreisen mit DME-Funden

BL	Landkreis	US		EA		SA	SA	DME gesamt	
		SW	EA	pos.	SA	pos.	ETF	absolut	anteilig (%)
MV	Güstrow	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	4	
MV	Müritz	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	1	
NI	Emsland	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	1	
SN	Görlitz	30	0	0	0	0	0	2	
MV	Ostvorpommern	86	0	0	0	0	0	5	
ST	Salzlandkreis	1.080	70	9	1.010	24	28	33	3,06
BB	Brandenburg, Stadt	519	519	11	0	0	0	11	2,12
NW	Coesfeld	253	0	0	0	0	0	4	1,58
ST	Dessau-Roßlau, Stadt*	1.181	879	7	302	9	3	16	1,36
BB	Frankfurt (Oder), Stadt	540	131	0	409	6	1	6	1,11
MV	Bad Doberan	1.016	4	0	1.012	7	5	8	0,79
ST	Stendal	566	51	0	515	3	0	3	0,53
MV	Demmin	2.653	5	0	2.648	11	0	11	0,42
SH	Herzogtum Lauenburg	5.714	151	0	5.563	13	2	14	0,25
BB	Dahme-Spreewald	3.097	718	5	2.379	2	0	7	0,23
MV	Nordvorpommern	8.754	0	0	8.754	3	0	3	0,03
BB	Barnim	2.984	0	0	0	0	0	1	0,03
BB	Teltow-Fläming	3.340	0	0	3.340	1	0	1	0,03
BB	Uckermark	4.528	0	0	0	0	0	1	0,02
BB	Potsdam-Mittelmark	5.491	0	0	0	0	0	1	0,02

BL: Bundesland; US: Anzahl der untersuchten Stücke Schwarzwild; EA: durchgeführte Einzeluntersuchungen; EA pos.: im Einzelansatz als positiv identifizierte Stücke; SA: durchgeführte Sammeluntersuchungen; SA pos.: positiver Sammelansatz; SA ETF: Identifikation positiver Stücke aus einem Sammelansatz, k. A.: keine Angabe

Der Landkreis Görlitz hat keine Angaben zur Jahresuntersuchungszahl gemacht. Dementsprechend wurden die beiden eingereichten Einzelerhebungsbögen mit je einem Sammelansatz von jeweils 15 Tieren abgegeben als Grundlage für die Berechnung verwendet. Ebenso verhält es sich beim Landkreis Ostvorpommern mit nur 87 Tieren aus den Einzelmeldungen.

Lässt man die oben genannten Abweichungen außer Acht, dann bewegt sich der Befund „DME in Schwarzwild“ bezogen auf die Jahresuntersuchungszahl in den einzelnen Kreisen im Jahr 2008 zwischen 0,02 und 2,87% sowie 0,02 und 3,06% im Jahr 2009.

Abbildung 6 zeigt die Melde- und Fundsituation der Jahre bis 2009. In der Darstellung sind alle bis zum 28.07.2010 eingegangenen Meldungen für Untersuchungen und Funde bis Ende 2009 berücksichtigt.

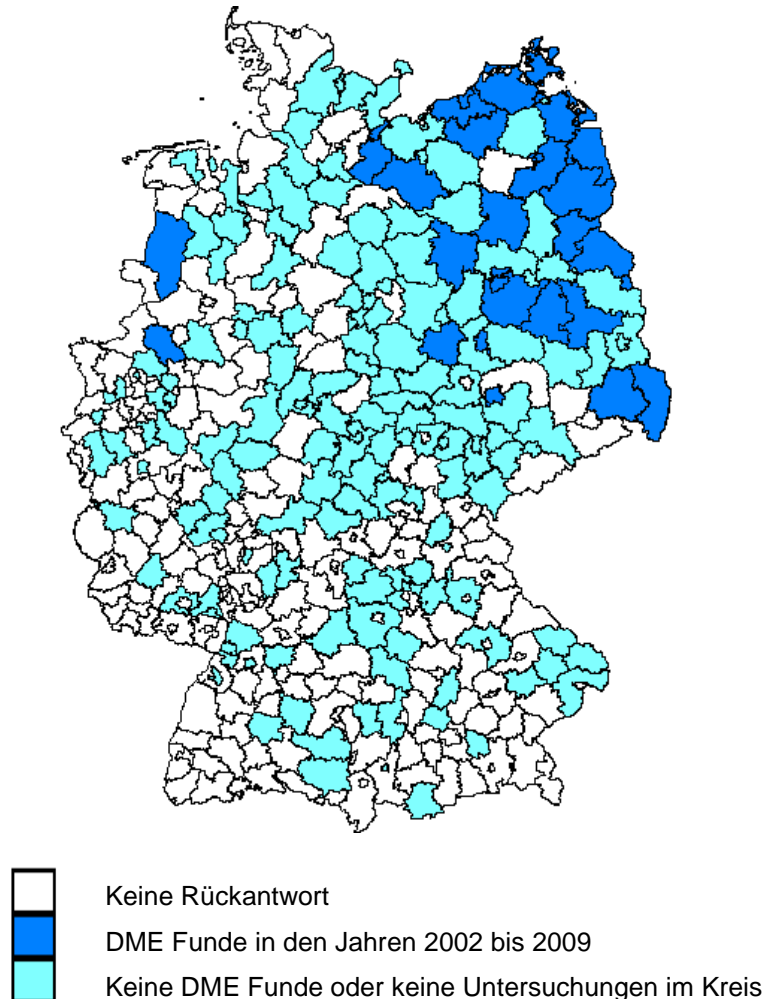


Abbildung 6 Graphische Darstellung zur Umfrage Duncker'scher Muskelegel und Schwarzwilduntersuchung (Erhebungsbögen) bis Ende 2009.

Neue Meldungen aus 2010 weisen darauf hin, dass immer häufiger Funde von Duncker'schen Muskelegeln bei der Routineuntersuchung von Schwarzwild auftreten. Dies betrifft zunehmend auch neue Landkreise aus Bundesländern, die noch nie Funde von Duncker'schen Muskelegeln hatten.

3.1.4 Meilenstein Tenazität/Spezies

3.1.4.1 Überlebensfähigkeit der Mesozerkarien in Rohwurst

Tabelle 14 zeigt, dass die Überlebensfähigkeit der Mesozerkarien in Rohwürsten die nach einer gängigen Rezeptur hergestellt wurden, offensichtlich gering ist. Während 60 Minuten nach der Herstellung der Rohwurstmasse noch lebende Mesozerkarien aus der beimpften Rohwurstmasse mit Hilfe der AMT isoliert werden konnten, war schon nach einem Tag die Detektion vitaler Mesozerkarien nicht mehr möglich. Diese ersten Ergebnisse deuten an, dass die Verarbeitung von mesozerkarienhaltigem Wildfleisch zu Rohwürsten oder Rohschinken durchaus die Option einer Brauchbarmachung von positiven Tieren beinhaltet, es sind jedoch weitere Challengeversuche notwendig um die tatsächliche Tenazität der Mesozerkarien gegenüber pH- und a_w -Wert-Änderungen und Erhöhung der Kochsalzkonzentration bzw. die Tenazität gegenüber in der Rohwurstherstellung gängigen NPS-Konzentrationen zu überprüfen und das humane alimentäre Expositionsrisiko besser abschätzen zu können.

Tabelle 14: Untersuchung von Rohwürsten aus mesozerkarienhaltigem Ausgangsmaterial

Untersuchungszeitpunkt	1. Untersuchung ¹	2. Untersuchung ¹
1 h, b	5 v	3 v
1. Tag, n	∅	1 t
b	1 t	∅
2. Tag, n	5 t	4 t
b	1 t	1 t
3. Tag, n	1 t	∅
b	4 t	2 t
4. Tag, n	∅	∅
b	1 t	∅
5. Tag, n	2 t	1 t
b	∅	1 t
6. Tag, n	∅	∅
b	∅	∅

¹ parallel durchgeführte AMT mit je 30 g Probenmaterial; UZ: Untersuchungszeitpunkt nach Herstellung n: nicht beimpft; b: beimpft mit je fünf vitalen Duncker'schen Muskelegeln; t: tote Larven, v: vitale Larven

3.1.4.2 Kältetoleranz

Bei der Untersuchung einer Rückstellprobe aus der amtlichen Untersuchung auf Trichinellen, welche 10 Tage bei -18°C in einem kooperierenden Veterinäramt gelagert wurde, wurden bei der Untersuchung im eigenen Labor mittels AMT mehrere vitale Mesozerkarien gefunden. Aus diesem Grund wurden mehrere Versuche zur Kältetoleranz der Mesozerkarien bei Temperaturen von -20°C durchgeführt. Die ersten Ergebnisse (Versuche 1-7) zeigen, dass in allen Fällen bereits nach 24 Stunden keine lebenden Mesozerkarien mehr aus dem Gewebe isoliert werden konnten. Die Gründe für die ausgesprochen hohe Kältetoleranz einzelner Isolate konnte bislang noch nicht geklärt werden. Möglich sind zum einen genetische determinierte Unterschiede zum anderen kommt eine Interaktion der Mesozerkarien mit dem umliegenden Gewebe in Betracht. So ist beispielsweise eine protektive Wirkung von dem die Larve umgebenden Fettgewebe denkbar. In einem ersten Versuch, bei dem vitale Mesozerkarien in Flomen vom Schwein eingebracht wurden, konnte dieser Erklärungsversuch jedoch nicht belegt werden; alle eingebrachten Mesozerkarien waren hier bereits nach 24 h bei -20°C abgestorben (3.1.4.2.8).

3.1.4.2.1 Versuch 1

330 g Probenmaterial von Tier 52 aus Kaumuskulatur (70 Larven in 110 g), Backe (77 Larven in 110 g) und Zwerchfell (49 Larven in 110 g). Das Gewebe wurde gleichmäßig auf die drei 110 g Proben (24 h, 72 h, 10 Tage) verteilt.

Untersuchungsmethode	24 h	72 h	10 Tage
Magnetrührverfahren (50g)	Ø	Ø	Ø
1. AMT (30 g)	Ø	Ø	Ø
2. AMT (30 g)	Ø	Ø	Ø

t = tote Larven

3.1.4.2.2 Versuch 2

330 g Probenmaterial von Tier 52 aus Bauchfell (35 Larven in 110 g) und Zwischenrippe (89 Larven in 110 g). Das Gewebe wurde gleichmäßig auf die drei 110 g Proben (24 h, 72 h, 10 Tage) verteilt.

Untersuchungsmethode	24 h	72 h	10 Tage
Magnetrührverfahren (50g)	1 t	Ø	Ø
1. AMT (30 g)	Ø	Ø	Ø
2. AMT (30 g)	Ø	Ø	3 t

t = tote Larven

3.1.4.2.3 Versuch 3

330 g Probenmaterial von Tier 52 aus Lende (7 Larven in 110 g) und Zwischenrippe (89 Larven in 110 g). Das Gewebe wurde gleichmäßig auf die drei 110 g Proben (24 h, 72 h, 10 Tage) verteilt.

Untersuchungsmethode	24 h	72 h	10 Tage
Magnetrührverfahren (50g)	Ø	Ø	Ø
1. AMT (30 g)	Ø	Ø	Ø
2. AMT (30 g)	Ø	Ø	3 t

t = tote Larven

3.1.4.2.4 Versuch 4

330 g Probenmaterial von Tier 53 aus dem Bauch (116 Larven in 110 g). Das Gewebe wurde in drei 110 g Proben (24 h, 72 h, 10 Tage) unterteilt.

Untersuchungsmethode	24 h	72 h	10 Tage
Magnetrührverfahren (50g)	1 t	Ø	Ø
1. AMT (30 g)	3 t	Ø	Ø
2. AMT (30 g)	Ø	Ø	Ø

t = tote Larven

3.1.4.2.5 Versuch 5

330 g Probenmaterial von Tier 53 aus dem Bauch (116 Larven in 110 g). Das Gewebe wurde in drei 110 g Proben (24 h, 72 h, 10 Tage) unterteilt.

Untersuchungsmethode	24 h	72 h	10 Tage
Magnetrührverfahren (50g)	Ø	Ø	2 t
1. AMT (30 g)	Ø	Ø	Ø
2. AMT (30 g)	Ø	Ø	Ø

t = tote Larven

3.1.4.2.6 Versuch 6

330 g Probenmaterial von Tier 53 aus dem Bauch (116 Larven in 110 g). Das Gewebe wurde in drei 110 g Proben (24 h, 72 h, 10 Tage) unterteilt.

Untersuchungsmethode	24 h	72 h	10 Tage
Magnetrührverfahren (50g)	∅	∅	1 t
1. AMT (30 g)	∅	∅	∅
2. AMT (30 g)	∅	∅	1 t

t = tote Larven

3.1.4.2.7 Versuch 7

90 g Probenmaterial von Tier 53 aus der Zunge (105 Larven in 110 g). Es waren nur noch 90 g Zunge dieses Tieres vorhanden, daher konnte nur eine Larvenauswanderung als Untersuchung durchgeführt werden.

Untersuchungsmethode	24 h	72 h	10 Tage
1. AMT (30 g)	∅	∅	∅

t = tote Larven

3.1.4.2.8 Einfrierversuch mit Flomen vom Hausschwein

Grob zerkleinertes Flomen vom Hausschwein wurden mit lebenden Mesozerkarien dotiert und das so hergestellte Probenmaterial nach verschiedenen Temperatur/Zeit Verläufen mittels des modifizierten Auswanderverfahrens untersucht.

	frisch	24 h	72 h	10 Tage
1. Auswanderung (30 g)	5 v	∅	∅	∅
2. Auswanderung (30 g)	5 v	∅	∅	3 t
3. Auswanderung (30 g)	4 v	2 t	∅	1 t
4. Auswanderung (30 g)	-	∅	∅	2 t
5. Auswanderung (30 g)	-	∅	∅	4 t

t = tote Larven; v = lebende Larven

3.1.4.3 *Alaria alata* PCR

3.1.4.3.1 Morphologische und morphometrische Identifikation

Alle 20 untersuchten Isolate wurden anhand ihrer speziellen Morphologie als *Alaria alata* identifiziert (siehe Tabelle 3).

3.1.4.3.2 Identifikation der rDNA mittels PCR

Die PCR der ribosomalen DNA von 20 ausgewählten *Alaria* Isolaten lieferte das erwartete Fragment von 303bp. Als Positivkontrollen wurden durch das Bundesinstitut für Risikobewertung als *Alaria alata* identifizierte Isolate genutzt, als Negativkontrollen dienten *Trichinella spiralis* Isolate aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung. Alle 20 morphologisch identifizierten *Alaria* Isolate konnten mithilfe der neuentwickelten PCR auch molekularbiologisch eindeutig als *Alaria alata* identifiziert werden.

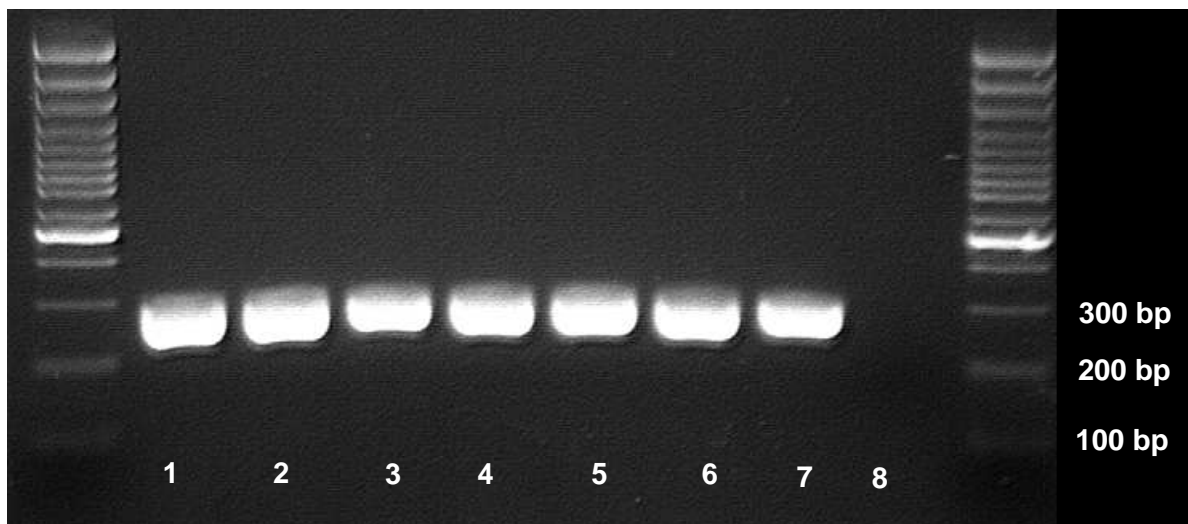


Abbildung 7: PCR Analyse eines Parasiten Isolates mithilfe spezifischer Oligonucleotid Primer: Spur 1-6: Morphologisch identifizierte *Alaria* spp. Isolate aus verschiedenen Wildschweinen; Spur 8: Negativkontrolle (*Trichinella spiralis*)

Im Rahmen der Genotypisierung mittels Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)-Analyse konnten bisher die Verwandtschaftsgrade von 18 zuvor molekularbiologisch identifizierten *Alaria alata* Isolaten aus verschiedenen Teilen Deutschlands untersucht werden. Hierbei konnte ein Verwandtschaftsgrad von mindestens 60% zwischen den einzelnen Isolaten festgestellt werden.

3.2 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die im Rahmen des Forschungsprojektes durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Eignung des Referenzverfahrens zur künstlichen Verdauung von Sammelproben gem. VO (EG) Nr. 2075/2005 zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels in Wildfleischproben belegen, dass diese Methodik als nicht geeignet für den DME-Nachweis betrachtet werden muss. Demzufolge ist eine wissenschaftliche Bewertung des realen humanen Expositionsrisikos bislang nicht möglich, da die vornehmlich mit dem Referenzverfahren erfassten Ergebnisse hinsichtlich

- (i) der Verteilung des Duncker'schen Muskelegels im paratenischen Wirt sowie
- (ii) der Erfassung der geographischen Verbreitung und Häufigkeit des Vorkommens des DME und
- (iii) seiner Befallsstärke in Wildbret

unter dem Caveat erheblicher Fehlraten interpretiert werden müssen. Durch den Einsatz der neuentwickelten *Alaria alata* mesocercariae migration technique (AMT) besteht nun erstmals die Möglichkeit diese Wissenslücken zu schließen. Erste vergleichende Analysen haben gezeigt, dass sich die AMT aufgrund ihrer ausgesprochen hohen Sensitivität und Wiederfindungsrate einerseits als Referenzverfahren für den Nachweis des Duncker'schen Muskelegels in Fleisch anbietet und sich andererseits, auf Grund des ausgesprochen geringen Kosten- und Zeitaufwandes für die Durchführung der Methodik, auch als Schnellmethode für den Einsatz in der amtlichen Überwachung eignen könnte.

Gleichzeitig können damit valide Daten zu Prävalenz und Infektionsstärke gewonnen werden, die in Verbindung mit den Ergebnissen der Untersuchungen zur Tenazität der Parasiten eine realistische Einschätzung des humanen Expositionsrisikos erlauben und in der Folge eine abschließende Risikobewertung ermöglichen würde. Zusätzlich könnte auf dieser Basis die rechtliche Grundlage einer angemessenen fleischhygienerechtlichen Beurteilung erarbeitet werden, die die zurzeit herrschende Rechtsunsicherheit bei der Beurteilung DME positiver Stücke beseitigen würde. Eine solche rechtliche Grundlage kann, unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Tenazitätsuntersuchungen, auch ein zugelassenes Behandlungsverfahren für die Brauchbarmachung von Wildfleisch, welches mit dem Duncker'schen Muskelegel infiziert ist, enthalten. In der Folge könnten damit erhebliche Unsicherheiten im vorbeugenden Verbraucherschutz sowie wirtschaftliche Verluste vermieden werden.

Der Einsatz der AMT innerhalb der Routinediagnostik setzt jedoch die Validierung der Methode im Rahmen von Ringversuchen voraus, in denen zum einen die Eignung der eingesetzten Standardmaterialien überprüft und zum anderen die Optimierung der Untersuchungsmethode sowie die Erarbeitung statistischer Kenngrößen ermöglicht werden. Weiterhin könnten in der Folge dann Monitoringuntersuchungen durchgeführt werden, die, ergän-

zend zur durchgeführten Prävalenzstudie, erstmals flächendeckend die Klärung der tatsächlichen Vorkommenshäufigkeit des Erregers in der Wildtierpopulation ermöglichen würden.

Parallel zu Planung, Vorbereitung, Durchführung und abschließender Auswertung eines entsprechenden Ringversuchs könnten innerhalb eines Folgeprojektes die bereits begonnenen Untersuchungen hinsichtlich der Tenazität der Mesozerkarien gegenüber verschiedenen physikalischen und chemischen Parametern mit dem neuen AMT-Verfahren sowie der Identifizierung von Speziesunterschieden auf morphologischer und insbesondere molekularbiologischer Ebene und Erfassung der genetischen Diversität innerhalb der europäischen *Alaria alata*-Population mithilfe der AFLP-Analyse abgeschlossen werden. Hier ist vor allem die Zusammenarbeit mit internationalen Laboratorien anzustreben um einen Austausch phänotypisch differenter Isolate aus verschiedenen EU-Mitgliedsstaaten zu gewährleisten und diese genotypisch zu charakterisieren. Im Rahmen des Projektes konnten in diesem Zusammenhang bereits erste Kontakte zu Prof. Dr. Edoardo Pozio (Europäisches Referenzlabor für Trichinellen, Istituto Superiore di Sanità, Rom) geknüpft werden.

Die wichtigsten im Rahmen des Forschungsprojektes gewonnenen Erkenntnisse wurden 2009 und 2010 in Rahmen von verschiedenen Vorträgen, Postern und Zeitschriftenbeiträgen auf nationaler und internationaler Ebene publiziert (s. Literaturverzeichnis). Zwei ausgewählte Beiträge, die in der internationalen Fachzeitschrift „Parasitology Research“ erschienen sind, sowie mehrere, z. T. prämierte Posterbeiträge und Abstracts zu ausgewählten Vorträgen finden sich im Anhang.

4 Zusammenfassung

Seit der ersten Veröffentlichung von Funden des Duncker'schen Muskelegels (DME) in Wildschweinen im Land Brandenburg (Große und Wüste 2004) kommt es auf dem gesamten Gebiet der Bundesrepublik regelmäßig zu Meldungen über Nachweise dieses Parasiten in Wildfleisch. Meist handelt es sich hierbei um Zufallsbefunde, welche im Rahmen der amtlichen Trichinellenuntersuchung mithilfe des unter Anh. I, Kap. I der VO (EG) Nr. 2075/2005 beschriebenen Magnetrührverfahrens für die künstliche Verdauung von Sammelproben, erhoben werden. Eine spezifische Nachweismethode für *Alaria* spp. Mesozerkarien fehlte bislang und das Bundesinstitut für Risikobewertung wies in seiner Stellungnahme Nr. 027/2007 vom 1. Juli 2007 mit dem Hinweis auf eine mögliche Gefährdung der Verbraucher explizit auf die Notwendigkeit der Entwicklung eines geeigneten diagnostischen Verfahrens zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels hin (BfR 2006). Im Hinblick auf die Fleischuntersuchung bei frei lebendem Wild gem. Kap. VIII der Verordnung (EG) Nr. 854/2004 ist das Fleisch nicht nur im Falle des Vorkommens von Trichinellen, sondern auch dann für genussuntauglich zu erklären, wenn die Untersuchung auf Merkmale (einschließlich Parasitenbefall) hinweist, dass das Fleisch gesundheitlich bedenklich ist. Das BfR legte unter Bezugnahme auf die oben genannte Verordnung fest, dass für den Fall des Nachweises des Duncker'schen Muskelegels im Fleisch dieses aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes als untauglich für den menschlichen Verzehr beurteilt werden soll (BfR 2006).

Die im Rahmen des Forschungsprojektes durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass mit dem Magnetrührverfahren für die künstliche Verdauung von Sammelproben nach VO (EG) Nr. 2075/2005 die Mesozerkarien von *Alaria* spp. nicht zuverlässig nachgewiesen werden können. Die Nachteile der Methode zeigen sich sowohl bei der Auswahl des Probenmaterials, welches lt. Anh. I, Kap. I, Nr. 2 der VO (EG) Nr. 2075/2005 „frei von Fett- und Bindegewebe“ sein soll, als auch bei der artifiziellen Verdauung mittels HCl und Pepsin. Die für das Verfahren verwendeten Konzentrationen von HCl und Pepsin führen zu einem Absterben und einer schrittweisen Auflösung der DME. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass *Alaria alata* Mesozerkarien, anders als die meisten *Trichinella* Spezies, nicht durch eine Kapsel geschützt sind. Die abgestorbenen Larven sind in der stereomikroskopischen Untersuchung nur sehr schwer zu identifizieren. Dies hat eine bisher unbekannte aber sicher nicht unerhebliche Zahl von falsch negativen Befunden zur Folge, was im Sinne eines vorbeugenden Verbraucherschutzes und in Anbetracht der potentiell hohen Pathogenität des Parasiten nicht zu akzeptieren ist. Besondere Probleme ergaben sich in der Praxis bei der Beurteilung von DME-positiven Poolproben, bei denen eine Differenzierung der positiven Einzelproben nicht möglich ist.

Aus den genannten Gründen ergab sich die Notwendigkeit der Entwicklung einer geeigneten Nachweismethode zur sicheren Detektion der Mesozerkarien in verschiedenen Körpergeweben der paratenischen Wirte. Auf der Basis der eigenen Untersuchungen sowie Hinweisen aus der Literatur wurde eine alternative Nachweismethode für DME in verschiedenen Körpergeweben entwickelt. Die Methode basiert auf einem Larvenauswanderverfahren, welches mit der so genannten Baermann Methode vergleichbar ist. Das modifizierte Larvenauswanderverfahren zeigt im direkten Vergleich gegenüber dem Magnetrührverfahren für die künstliche Verdauung von Sammelproben eine um fast 60% gesteigerte Sensitivität und bietet eine einfach zu handhabende, robuste und preiswerte Methode zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels in verschiedenen Zielgeweben der paratenischen Wirte.

Parallel zu den Untersuchungen zur Methodik wurde das Verteilungsmuster der Parasiten im Wildschwein untersucht. Es zeigte sich, dass sich die Parasiten offenbar sehr heterogen im Körper der paratenischen Wirte verteilen und dass sich das Verteilungsmuster grundlegend von dem von *Trichinella* spp. unterscheidet. Gleichzeitig wurde deutlich, dass DME Lokalisationen mit hohen Anteilen von inter- und intramuskulärem Fett- und Bindegewebe sowie Knorpel- und Drüsengewebe bevorzugt.

Die bisher erfassten Daten zur Prävalenz, die allerdings aufgrund der defizitären Methodik unter dem Caveat erheblicher Fehlraten interpretiert werden müssen, zeigen, dass der Duncker'sche Muskelegel bis lang vor allem in den wasser- und sumpfreichen Gebieten der neuen Bundesländer auftritt. Hier ist sowohl bei den Endwirten, als auch bei den paratenischen Wirten mit einer hohen Durchseuchung und mit hohen Befallszahlen zu rechnen. Nichtsdestoweniger zeigen die per Fragebogen erhobenen Daten, dass zunehmend auch Gebiete in den alten Bundesländern, die ein entsprechendes Landschaftsprofil aufweisen, betroffen sind. Weiterhin ist vor dem Hintergrund des Wegfalls der Möglichkeit zur trichinoskopischen Untersuchung von Haus- und Wildschweinen gemäß Anhang I Kapitel III der VO (EG) Nr. 2075/2005 seit dem 01.01.2010 mit einer erhöhten Anzahl positiver Proben zu rechnen.

Die im Rahmen des Forschungsprojektes durchgeführten Untersuchungen zur Tenazität des Duncker'schen Muskelegels haben deutliche Unterschiede hinsichtlich der Widerstandsfähigkeit einzelner Isolate gegenüber verschiedenen physikalischen und chemischen Belastungen ergeben. Diese Daten können als Basis für die eventuelle rechtliche Implementierung von Behandlungsverfahren für die Brauchbarmachung von Wildfleisch, welches mit dem Duncker'schen Muskelegel infiziert ist, dienen. Gleichzeitig können die festgestellten Unterschiede hinsichtlich der Morphologie, Verteilung im Tierkörper und auch der Tenazität der isolierten Mesozerkarien auch als ein Hinweis auf das Vorkommen verschiedener *Alaria* Spezies in Westeuropa gewertet werden, was nach erfolgreicher Etablierung einer geeigneten molekularbiologischen Nachweismethode nun überprüft werden kann.

5 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Die im Projektantrag definierten Aufgabenstellungen hinsichtlich der Erarbeitung einer geeigneten Methodik, der Definition geeigneter Prädilektionsstellen und einer ersten Erfassung der Prävalenz konnten im Rahmen der vorgegebenen Projektlaufzeit erfolgreich bearbeitet werden und abgeschlossen werden. Es ist allerdings zu beachten, dass erst der flächendeckende Einsatz der neuentwickelten AMT belastbare Daten zu den genannten Fragestellungen erbringen kann, da ein nicht unerheblicher Teil der bislang erhaltenen Ergebnisse auf Untersuchungen basiert, die mittels Magnetrührverfahren für die künstliche Verdauung von Sammelproben erstellt wurden. Dies gilt insbesondere für die Erfassung der Prävalenzdaten da die AMT in der amtlichen Überwachung aufgrund der bislang fehlenden Validierung des Verfahrens hier nicht, oder nur in sehr wenigen Fällen, zum Einsatz kommen konnte. Im Hinblick auf eventuelle Folgeprojekte sollte somit unbedingt die Weiterentwicklung und Validierung der AMT im Vordergrund stehen. Ein zu diesem Zweck durchgeführter Ringversuch würde sowohl die Optimierung der Untersuchungsmethode als auch die Erarbeitung statistischer Kenngrößen ermöglichen. Gleichzeitig könnte das Verfahren so auf seine Eignung als Schnelltest im Rahmen der amtlichen Überwachung hin überprüft werden und es bestände die Möglichkeit Monitoring-Untersuchungen, die die Klärung der tatsächlichen Vorkommenshäufigkeit des Erregers in der Wildtierpopulation ermöglichen, aufzunehmen. Erst dann kann auch eine Abschätzung und endgültige Bewertung des alimentären humanen Expositionsriskos durch den Duncker'schen Muskelegel in Wildbret erfolgen. Hierzu gehört auch die Durchführung weiterer Untersuchungen zur Überprüfung der Tenazität der Mesozerkarien gegenüber verschiedenen physikalischen und chemischen Parametern, da die bislang erfolgten Untersuchungen nur einen ersten Hinweis auf die tatsächliche Widerstandsfähigkeit einzelner Isolate geben können und weitere Daten auch im Hinblick auf eine eventuelle rechtliche Implementierung von Behandlungsverfahren für die Brauchbarmachung von Wildfleisch, welches mit dem Duncker'schen Muskelegel infiziert ist, unbedingt erforderlich sind. Die Identifizierung von *Alaria alata* Isolaten auf morphologischer und insbesondere molekularbiologischer Ebene konnte im Projektzeitraum erfolgreich durchgeführt werden. Hier sind in der Folge eine Optimierung der PCR-Methode und die Erfassung der genetischen Diversität innerhalb der europäischen *Alaria alata*-Population mithilfe der AFLP-Analyse anzustreben.

6 Literaturverzeichnis

- ANDREAS, K (2006) Helminthen einheimischer Froschlurche. Dissertation. Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin Journal- Nr. 3048, 122 S.
- BAERMANN G (1917) Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum- (Nematoden)-Larven in Erdproben. Welteureden. Batavia. Geneesk. Lab. Feestbundel :41–47
- BEAVER, P.C., LITTLE, M.D., TUCKER, C.F. und J.R. REED (1977) Mesocercaria in the skin of a man in Louisiana. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26:422
- BFR (2007) Bundesinstitut für Risikobewertung. Wildschweinfleisch kann den gesundheitsgefährlichen Duncker'schen Muskelegel enthalten. Stellungnahme Nr. 027/2007 des BfR vom 1. Juli 2007
- BOCH, J. und R. SUPPERER (1992) Veterinärmedizinische Parasitologie. Parey Verlag Berlin, 4. Auflage, S. 460.
- BUGGE G (1942) Das sogenannte Muskeldistomum, Agamodistomum suis, ein Bewohner der Bauchhöhle des Schweines. Tierärztl Rdsch 48:146–151
- BYERS, B. und S.J. KIMURA (1974) Uveitis after death of a larva in the vitreous cavity. Am. J. Ophthalmol 77:63-66
- EG (2005) Verordnung (EG) Nr. 2075/2005 vom 5. Dezember 2005 mit spezifischen Vorschriften für die amtlichen Fleischuntersuchungen auf Trichinen. ABl. Nr. L338: 60-82
- FERNANDES, B.J., COOPER, J.D., FREEMAN, R.S., RITSCHIE, A.C., SCOTT, A.A. und P.F. STUART (1976) Systemic infection with *Alaria americana* (Trematoda). Can. Med. Assoc. J. 115 (11):1111-1114.
- FREEMAN R.S., STUART, P.F., CULLEN, J.B., RITCHIE, A.C. MILDON, A., FERNANDES, B.J. und R. BONIN (1976) Fatal human infection with mesocercariae of the trematode *Alaria americana*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 25 (6): 803-807
- GROßE, K. und T. WÜSTE (2006) Der Duncker'sche Muskelegel. Funde bei der Trichinenuntersuchung mittels Verdauungsverfahren. Fleischwirtschaft 4/2006:106-108
- GROßE, K. und T. WÜSTE (2008) Duncker'scher Muskelegel – Risiko für den Verbraucher? Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung, 60:208-210
- HAMEDY A., MÖHL K., GROßE K. und LÜCKER E. (2009) Untersuchungen zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels in Wildschweinen. 50. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene. Garmisch-Partenkirchen, 29.09.-02.10.2009
- HARTO M.A., RODRIGUEZ-SALVADOR V., AVINO J.A., DUCH-SAMPER A.M. und MENEZO J.L. (1999) DUSN in Europe. Eur J Ophthalmol 9:58–62

- HIEPE, T., BUCHWALDER, R. und S. NICKEL (1985) Veterinärmedizinische Helminthologie. In: HIEPE, T. (Hrsg.) Lehrbuch der Parasitologie. Band 3. G. Fischer Verlag, Stuttgart, S.132
- KABELITZ P., FRANZKE K., HAMEDY A., MÖHL K. und LÜCKER E. (2009) Studien zur Prävalenz der Mesozerkarie von *Alaria alata* in Wildschweinen in der Uckermark. 50. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene. Garmisch-Partenkirchen, 29.09.-02.10.2009
- KOCH H. und FUCHS M. (2004) Die Fabrikation feiner Fleisch- und Wurstwaren, 21. überarbeitete und erweiterte Auflage Rezept 2-017, S. 145
- KRAMER, M.H. EBERHARD, M.L. und T.A. BLANKENBERG (1996) Respiratory symptoms and subcutaneous granuloma caused by masocercariae: A case report. Am. J. Trop. Med. Hyg. 55 (4):447-448
- KÜCHLE M., KNORR H.L.J., MEDENBLIK-FRYSCH S., WEBER H., BAUER C. und NAUMANN G.O.H. (1993) DUSN syndrome in a German most likely caused by the racconon roundworm, *Baylissascaris procyonis*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 231:48–51
- KÜCHLE M. und NAUMANN G.O.H. (1996) Intraokulare Entzündungen. In: Naumann GOH (Hrsg) Pathologie des Auges. Springer
- LÜCKER E., MÖHL K., HAMEDY A., WÜSTE T., KABELITZ P. und GROßE K (2009) Detection of *Alaria* spp. mesocercariae in game meat in Germany. International Research Forum on Game Meat Hygiene, Brno, Czech Republic
- MEHLHORN H. (2008) Encyclopedia of parasitology. Third edition. Springer
- MCDONALD, H.R., KAZAKOS, K.R., SCHATZ, H. und R.N. JOHNSON (1994) Two cases of intraocular infection with *Alaria alata* (Trematoda). Am. J. Ophthalmol. 117 (4): 447-455
- MIKKONEN T.P., KÄRENLAMPI R.I. und HÄNNINEN M.L. (2004) Phylogenetic analysis of gastric and enterohepatic *Helicobacter* species based on partial HSP60 gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 54(Pt 3):753-8.
- MÖHL K., FEHLHABER K. und LÜCKER E. (2009) Lebensmittelassoziierte parasitäre Zoonosen – eine neue Herausforderung an die Lebensmittelhygiene? Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung 12(61):477-481
- MÖHL K., FEHLHABER K., LUDEWIG M. und LÜCKER E. (2009) Lebensmittelassoziierte parasitäre Zoonosen – alte Probleme und neue Herausforderungen. DVG-Fachgruppe "Parasitologie und parasitäre Krankheiten" 17. bis 19. Juni 2009, Leipzig, Germany
- MÖHL K., GROßE K., HAMEDY A., KABELITZ P., WÜSTE T. und LÜCKER E (2009) Untersuchungen zum Nachweis und zur Prävalenz des Duncker'schen Muskelegels in Wildtierpopulationen - Erste Ergebnisse. 50. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, Germany, 29.09.-02.10.2009

- MÖHL K., GROSSE K., HAMEDY A., WÜSTE T., KABELITZ P. und LÜCKER E. (2009) Biology of *Alaria* spp. and human exposition risk to *Alaria mesocercariae*-a review. *Parasitol Res.* 105(1):1-15.
- MOKS E., JÖGISALU I., SAARMA U., TALVIK H., JÄRVIS T. und VALDMANN H. (2006) Helminthologic survey of the wolf (*Canis lupus*) in Estonia, with an emphasis on *Echinococcus granulosus*. *J Wildl Dis* 42 (2):359–365
- ODENING, K. (1961) Der Duncker'sche Muskelegel kann experimentell auf Affen übertragen werden. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 16:395-399
- ODENING K. (1963) Zur Diagnostik der Mesocercarie von *Alaria alata*, eines möglichen Parasiten des Menschen in Europa, an Hand experimenteller Befunde beim Affen. *Mber Dtsch Akad Wiss Berlin* 5:385–390
- OLSON P.D., CRIBBB T.H., TKACHD V.V., BRAYA R.A. und LITTLEWOOD D.T.J. (2003) Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *Int J Parasitol* 33:733–755
- OUEGHLANI E., O'SULLIVAN E. und PAVESIO C.E. (2010) Diffuse unilateral subacute neuroretinitis in the United Kingdom. *Int Ophthalmol* [Epub ahead of print]
- PEARSON J.C. (1956) Studies of the life cycles and morphology of the larval stages of *Alaria arisaemoides* (Augustine and Uribe, 1927) and *Alaria canis* (LaRue and Fallis, 1936) (Trematoda: Diplostomatidae). *Can J Zool* 34:295–387
- RIEHN K., GROßE K., HAMEDY A., WÜSTE T., KABELITZ P. und LÜCKER E (2009) *Alaria alata* – studies on detection, prevalence and biology of a re-emerging parasite
61st Annual Meeting of the German Society for Hygiene and Microbiology, Göttingen, Germany
- RIEHN K., HAMEDY A. und LÜCKER E. (2009) *Alaria alata* – a re-emerging parasite?
ECVPH Annual Conference, Leipzig, Germany
- RIEHN K., HAMEDY A., GROßE K., WÜSTE T., KABELITZ P. und LÜCKER E. (2010) Untersuchungen zum Nachweis und zur Prävalenz des Duncker'schen Muskelegels in Wildtierpopulationen - Erste Ergebnisse. 5. Leipziger Tierärztekongress 21.01-23.012010, Leipzig, Germany
- RIEHN K., HAMEDY A., GROßE K., KABELITZ P., WÜSTE T., ZEITLER L. und LÜCKER E. (2010) Untersuchungen zum Nachweis und zur Prävalenz des Duncker'schen Muskelegels in Wildschweinen - ein Update. 10. Fachtagung Fleisch- und Geflügelfleischhygiene 2.03.-03.03.2010, Berlin, Germany
- RIEHN K., HAMEDY A., GROßE K., ZEITLER L. und LÜCKER E. (2010) A novel detection method for *Alaria alata* mesocercariae in meat. *Parasitol Res.* 107(1):213-220

- SCHUSTER R., SCHIERHORN K., HEIDECHE D. und ANSORGE H. (1993) Untersuchungen zur Endoparasitenfauna des Marderhundes *Nyctereutes procynoides* (Gray, 1834) in Ostdeutschland. *Beitr Jagd Wildforschung* 18:83–87
- SHEA, M. MABERLEY A.L., WALTERS, J. FREEMAN R.S., und A.M. FALLIS (1973) Intraretinal larval trematode. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Orolaryngol.* 77 :784-791
- SHIMALOV V.V., SHIMALOV V.T. und SHIMALOV A.V. (2003) Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in southern Belarus. *Parasitol Res* 89(1):77–78
- STOKKERMANS T.J. (1999) Diffuse unilateral subacute neuroretinitis. *Optom Vis Sci* 76:444–454
- WÜSTE T., GROßE K., HAMEDY A., MÖHL K. und LÜCKER E. (2009) Funde des Dunker'schen Muskelegels im Rahmen der amtlichen Trichinellenuntersuchung. 50. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene. Garmisch-Partenkirchen, 29.09.-02.10.2009

Biology of *Alaria* spp. and human exposition risk to *Alaria mesocercariae*—a review

Katharina Möhl · Knut Große · Ahmad Hamedy ·
Tanja Wüste · Petra Kabelitz · Ernst Lücker

Received: 8 April 2009 / Accepted: 16 April 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Recent incidental background findings of *Alaria alata* mesocercariae [*Distomum muscularis suis*,” Duncker, 1896] in meat of wild boars during official *Trichinella* inspection initiated a re-assessment of the potential human health risk as posed by this parasite. The present review of the literature on *Alaria* biology shows that the human exposition risk should no longer be accepted to be negligible, as it demonstrates a general lack of knowledge in relevant areas of *Alaria* biology confounding any risk analysis. Sound risk assessment needs future studies which should concentrate on the most pressing questions of (1) the optimization and/or development of methods for reliable *Alaria* mesocercariae detection, (2) the distribution of the mesocercariae within their paratenic hosts, i.e., identification of potential predilection sites, particularly in wild boars, and (3) their prevalence in sylvatic populations of animals with respect to their

introduction into the human food chain. Further, the degree and possibly also the species specificity of *Alaria* mesocercariae tenacity within the paratenic hosts and respective meat as pertaining to food technological treatments need to be elucidated. While these questions remain unanswered, it is an incontrovertible fact that *Alaria* mesocercariae have a potentially high human pathogenicity by both occupational and alimentary exposition.

Introduction

Distomum musculorum suis (DMS), Duncker, 1896 (syn. *Agamodistomum suis*, Stiles, 1898) is the mesocercarial stage of the trematode *Alaria alata*, an intestinal parasite of some carnivores. The adult and metacercarial stages of these trematodes have little relevance as pathogens, whereas its mesocercarial stage is known to cause lesions in its paratenic hosts, in particular, in wild boars (Hiepe 1985, Odening 1963). Ljubaschenko and Petrov (1962) report about serious damages in fox, dogs, and arctic fox caused by DMS. The authors distinguish between two different disease patterns: the metacercarial alariosis manifests itself in the lungs, pleura, and the lymphatic vessels of the bronchia, while the adult parasites can cause inflammation of the bowel and a general intoxication (Ljubaschenko and Petrov 1962). Danijarow (1968) mentions high economic losses in fur farms caused by *A. alata*. Several human infections have been reported since Odening (1961a) recovered *A. alata* mesocercariae from an experimentally infected primate. Nevertheless, the risk for humans was generally ignored or at least postulated to be negligible until after about four decades this issue re-

K. Möhl (✉) · A. Hamedy · E. Lücker (✉)
Institute of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Leipzig,
Leipzig, Germany
e-mail: moehl@vetmed.uni-leipzig.de
e-mail: luecker@vetmed.uni-leipzig.de

K. Große · T. Wüste
Stadt Brandenburg an der Havel Gesundheits-,
Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt,
Klosterstraße 14, 14770 Brandenburg an,
der Havel, Germany

P. Kabelitz
Landkreis Uckermark, Gesundheits- und Veterinäramt,
Karl-Marx-Straße 1,
17291 Prenzlau, Germany

emerged in Europe: Jakšić et al. (2002) and Große and Wüste (2004, 2006) published results on repeated incidental findings of DMS in meat of wild boars during routine *Trichinella* inspection in certain areas of Croatia and Germany, respectively. In view of their findings, deficiencies in methodology, lack of data on prevalence, and the human DMS cases which were reported, they were the first to point out that the human DMS exposition risk is not negligible and would merit increased scientific attention. The Federal Office for the Environment (FOEN, Switzerland) categorized *A. alata* as a stage 2 risk (Z) for parasites with zoonotic potential (Anonymous 2003) as pertaining to occupational health risks. The Federal Institute of Risk Assessment (BfR 2007) finally concluded in its risk assessment that meat which contains *A. alata* mesocercariae should be regarded as unfit for human consumption. A final statement concerning the health risks for consumers could not be given due to the lack of information about both the prevalence of DMS and the suitability of *Trichinella* inspection methods to detect this parasite in wild boar meat (BfR 2007).

In the present paper, a review of the relevant knowledge on *Alaria* biology is given in order to further our understanding of potential consumer health risks which might be associated with this parasite.

History and taxonomy

The original description of the adult stage of *A. alata* in its definitive host was given by Goeze in 1782. Gestaldi (1854) first described the larval stage of the trematode ("*Distoma tetracystis*") in frogs, and upon trichinellosis control in Saxony, sexually immature trematodes were found in swine muscles, which were studied and described by Duncker in a number of communications (Duncker 1881a, b, 1884, 1896, 1897). It took nearly 50 years to show that there is a link between the appearance of the mesocercarial stage of the parasite in frogs and in pigs (Bugge 1942a). Stefansky and Tarczynski (1953) finally demonstrated the relation between *Alaria alata* and *Distomum musculorum suis*, Duncker, 1896.

A. alata (*Diplosomatidea*, *Strigeata*) is a parasitic trematode of carnivores in Europe and the former Soviet republics (Schnieder 2006). Further *Alaria* species can be found in North and South America: *A. mustelae* (Bosma 1931), *A. intermedia* (Olivier and Odlaug 1938), *A. marciana* (La Rue 1917), *Alaria arisaemoides* (Augustine and Uribe 1927), *Alaria canis* (La Rue and Falis 1934) (Paerson 1956), *Alaria taxideae* (Swanson and Erickson 1946). According to Sudarikov (1960) *A. mustelae* was also found in Europe; however, only in imported cases from America.

Morphology

The adult and mesocercarial stages of *Alaria* spp. are depicted in Fig. 1. The adult stage of *A. alata* measures approximately 3–6×1–2 mm (Schnieder 2006, Hiepe 1985, Wojcik et al., 2002). The body is clearly divided into two sections. The anterior end has a wing-like shape (*alata*, "winged") and contains four clavate cells, with granular cytoplasm and spherical nuclei, within the oral sucker. They are glandular in appearance, but ducts were not observed (Pearson 1956). The posterior end is short and cylindrical with a typical short intestine. The tribocystic organ shows a tongue-like shape (Hiepe 1985). The muscular ventral sucker, or acetabulum, measures approximately 0.04–0.1×0.04–0.09 mm and is therefore slightly smaller than the oral sucker (0.06–0.07×0.06–0.08 mm) (Andreas 2006). In order to receive nutrients, the ventral sucker is used for digestion and absorption of mucus and tissue from the wall of the host intestine (Roberts and Janovy, 2000). The lobed testicles of the male individuals are located one after the other in the rear body section. Anterior to them, the germarium is situated in the transient area of both body sections. The gonads of the female parasites lie in pairs in the anterior body region. *Alaria* species from North and South America differ morphologically in some aspects (Marshall 1972; Roberts and Janovy, 2000).

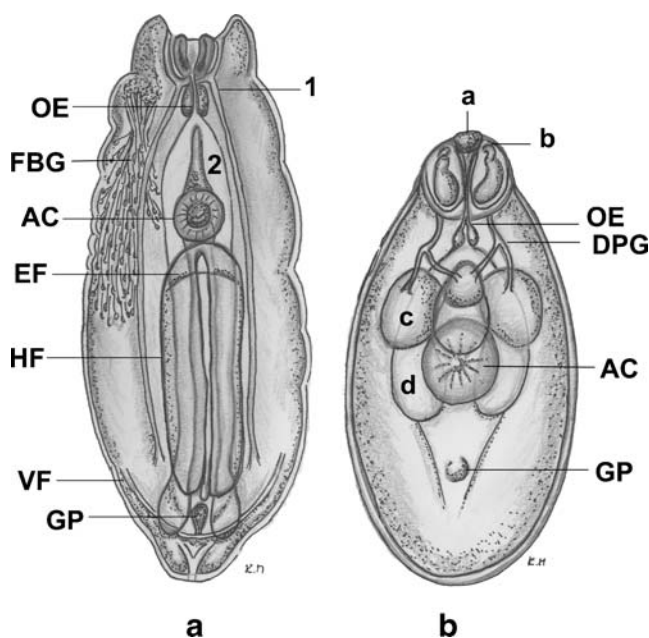


Fig. 1 Fully developed adult (a) and mesocercarial (b) stage of *Alaria* spp. 1 remnant of penetration gland duct, 2 caecum (elonged), OE oesophagus, FBG forebody glands and their ducts, AC acetabulum, EF edge of fold over anterior and of holdfast organ, HF holdfast organ, VF ventral lip of spathiform forebody, GP genital primordium, a oral opening and oral sucker, b gland cells, c penetration glands, d caecum, DPG duct of penetration gland

The eggs measure 110–140×70–80 μm (Hiepe 1985, Lucius et al., 1988). Development from egg to full-grown individual takes 92–114 days (Lucius et al., 1988).

The mesocercariae of *A. alata* are morphologically similar to the mesocercariae of american *Alaria* species (Odening 1961a). In the front body, anterior to the ventral sucker, lie two pairs of characteristic finely granular penetration glands which measure 300–500 μm and show a typical leaf-shaped appearance (Wirkerhauser 1980). According to Odening (1961a) the excretory bladder is V-shaped with dilatations at the posterior ends. Its branches lead in twisted attachments. These attachments are connected with the primary excretion system. The junction starts at the area approximately between the ventral sucker and the intestine, and the vessels bend laterally and to the rear, meandering until they reach the main excretory vessels. The reserve bladder system is developed within the larvae only in the form of a small anteromedial arranged tap (Odening 1961a). A ciliar trimming of the attachments, as shown in the respective larvae of *A. intermedia*, is missing (Olivier and Odlaug, 1938). In the rhesus monkey (scarpula region) the mesocercarial stage of *A. alata* is fully developed and enclosed by host tissue within 38 days (Odening 1963). The mesocercarial stage is characterized intra vitam by a unique motion sequence. In the stereomicroscopical examination for *Trichinella*, one “cannot but recognize it” (Große and Wüste 2006). This is illustrated by a sequence of single shots taken from a film of a DMS in typical motion in Fig. 2.

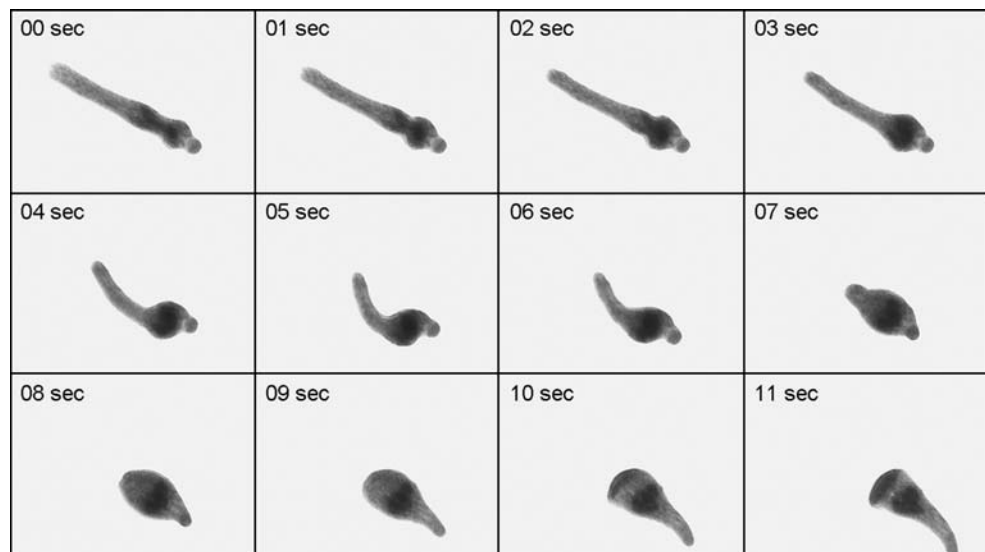
The metacercarial stage of *Alaria* spp. is a roundish, thin-walled, almost transparent vesicle of 0.4–0.7 mm length and 0.2 mm breadth with fine parallel lines on it (Hiepe 1985). In these cysts, one can recognize the whitish larva with a magnifying glass (Odening 1961b, 1963). The

reserve bladder system is, as within most *Strigeata* larvae, strongly developed and covers large parts of the primary excretion system (Komiya 1938, Odening 1961a, Savinov 1954).

Life cycle

The complete life cycle of *Alaria* species, as schematically depicted in Fig. 3, had been worked out in the middle of the twentieth century (Petrov et al., 1950a, 1950b, Potekhina 1950, Savinov 1953a, b, Savinov 1954). The role of DMS in connection with the cycle of *A. alata* was recognized only at this time (Dollfus and Chabaud 1953, Stefański and Tarczyński 1953). While the members of the genus *Strigea* have an obligatory four-host life cycle, *Alaria* spp. develop in a three-host life cycle with an interjectional mesocercarial stage between the cercarial and the metacercarial stage. This life cycle can be extended by paratenic hosts. The term “hôtes d’attente” was first characterized by Joyeux and Baer (1934). The original description of this kind of life-cycle as well as the term “mesocercaria” was given by Bosma (1934). The mesocercarial stage is a kind of “resting stage” which is characterized morphologically by persistence of penetrating glands and a cyst which is solely formed by the host’s connecting tissue. The mesocercaria can survive several host transitions unharmed. After breaking through the intestine wall of the new host, it behaves as in the preceding host (Bosma 1934, Hiepe 1985, Lutz 1933a, b, Lutz 1921, Odening 1963, Pearson 1958, Pearson 1956, Schnieder 2006). Adult flukes, residing in the intestines of the definitive hosts, pass unembryonated eggs through the feces of the host. After two weeks, these eggs hatch in water, releasing the miracidium. They

Fig. 2 *Alaria alata* from a film of *A. alata* mesocercaria in motion after HCL/Pepsin digestion



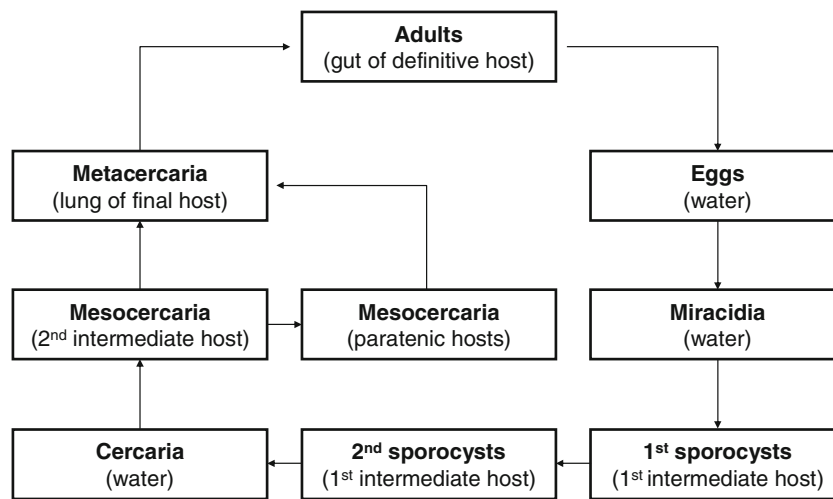


Fig. 3 Life cycle of *Alaria* species: developmental stages

actively penetrate and develop further in a snail host (*Planorbis*-, *Heliosoma*-, *Lymnea*- and *Anisus* species) (Bosma 1934, Cort and Brooks 1928, Nikitina 1986, Odlaug 1940, Pearson 1956, Potekhina 1951, Ruzskowski 1922, Wójcik 2001). In this first intermediate host the miracidiae reproduction starts and after nearly a year of maturation, daughter sporocysts release cercariae provided with a fork tail (furcocercariae). They show a high motility in the water until an appropriate second intermediate host is exposed to them. This host might be a tadpole, an adult frog or other amphibian in which the furcocercariae develop into mesocercariae. The spectrum of snails, frogs, and amphibians and their preference vary depending upon *Alaria* species as shown in Table 1.

In addition to the amphibian intermediate hosts, specified in Table 1, there are also paratenic hosts in the developmental cycle of *Alaria* spp., as already mentioned above. In this potential intermediate hosts, the larval parasites can survive when ingested, but they do not undergo any further development. They are also called “transport” or “auxillary intermediate” hosts (Wallace 1939, Baer 1951). These hosts may accumulate the mesocercariae with each transition, and they may also serve to pass over the infection from the aquatic to the terrestrial environment (Dönges 1969). While such hosts are not essential for the development of the parasite, they may be necessary for the completion of the life cycle for ecological reasons. For example, the intermediate host in which the larval stage develops obligatorily may not be included in the diet of the definitive host, whereas a paratenic host may be included. On the other hand, a paratenic host may be excluded from the diet of the definitive host in which case this host would be a “cul-de-sac” (Pearson 1956). The infection of these paratenic hosts takes place via the uptake of obligatory

second intermediate hosts. Then the mesocercaria migrates through the intestine wall into the musculature of the anterior body section and/or settles at or in the different organs. The further development of the mesocercariae takes place in the body of the definitive hosts. According to Odening (1963), only members of the *canidae* can act as definitive hosts for *A. alata*. More recent studies point to the fact, however, that other carnivores (*felidae*, *mustelidae*) can also serve as definitive hosts for the parasite (cf. following chapter). After the oral uptake of an infected auxiliary or obligatory second intermediate host by a definitive host, the metacercariae perform a somatic migration. After reaching the lungs, the mesocercariae change into the metacercarial stage, are swallowed, and develop into adult worms in the host’s small intestines (Cuckler 1940, 1949, Odening 1963, Pearson, 1956, Schnieder 2006). Migration and reorganization of the mesocercariae through the metacercarial stage (syn.: *Diplostomulum*) to the adult worm are continuous processes with no intermediary stationary phase.

With the excretion of eggs into the intestine of the definitive host by adult trematodes and the entry of the eggs in the environment, the infection cycle starts again.

Hosts

The mesocercarial stage is particularly nonspecific toward its hosts. All *Alaria* species have a broad spectrum of paratenic hosts and almost all representatives of vertebrate animal classes may act as a carrier for the mesocercariae. Within the paratenic host, the parasite does not lose its infectivity toward the definitive host (Odening 1960,

Table 1 Second intermediate hosts of Mesocercariae of *Alaria* species according to literature

<i>Alaria</i> species	Host species (Infection, stage)	References
<i>A. mustelae</i> (Bosma, 1934)	<i>Rana palustris</i> (adult, N) [2], <i>Rana catesbiana</i> (adult, N) [2], <i>Rana clamitans</i> (adult, N) [2], <i>Rana clamitans</i> (tadpole, E) [2], <i>Rana pipiens</i> (adult, N) [2], <i>Rana pipiens</i> (tadpole, E) [2], <i>Hyla regilla</i> (adult, N, E) [10]	Andreas 2006 [1] Bosma 1934 [2] Bugge 1942b [3] Cort 1918 [4]
<i>A. intermedia</i> (Olivier and Odlaug, 1938)	<i>Rana pipiens</i> (adult, N) [12], <i>Rana pipiens</i> (tadpole, E) [11]	Cort and Brooks 1928 [5] Cuckler 1941 [6]
<i>A. marcianae</i> (La Rue, 1917)	<i>Rana sp.</i> (tadpole, E) [5], <i>Rana pipiens</i> (adult, N) [6], <i>Rana pipiens</i> (tadpole, N) [4], <i>Rana sphenoccephala</i> (adult, N) [6], <i>Rana clamitans</i> (tadpole, N) [4]	Gastaldi 1854 [7] Goldberg et al., 2001 [8]
<i>A. alata</i> (Goeze, 1782)	<i>Rana esculenta</i> (N) [1,3,7], <i>Rana fusca</i> (N) [14], <i>Rana temporaria</i> (adult, N) [1, 3], <i>Rana temporaria</i> (tadpole, E) [14], <i>Pelobates fusca</i> (N) [14,16], <i>Rana arvalis</i> (adult, N) [1], <i>Bufo bufo</i> (adult, N), <i>Bufo calamita</i> (adult, N), <i>Bufo viridis</i> (adult, N) [15]	Goldberg et al., 1998 [9] Johnson et al., 1999 [10] Odlaug 1940 [11] Olivier and Odlaug 1938 [12]
<i>A. arisaemoides</i> (Augustine and Uribe, 1927)	<i>Bufo americanus</i> (tadpole, E) [13], <i>Rana sylvatica</i> (tadpole/adult, E) [13], <i>Rana pipiens</i> (tadpole/adult, E) [13]	Pearson 1956 [13] Potekhina 1951 [14]
<i>A. canis</i> (La Rue and Falis, 1934)	<i>Bufo americanus</i> (tadpole, E) [13], <i>Rana sylvatica</i> (tadpole, E) [13], <i>Rana pipiens</i> (tadpole/adult, E) [13], <i>Pseudacis nigrita</i> (tadpole, E) [13]	Shimalov et al., 2000 [15] Timofeev 1900 [16]
<i>Alaria</i> sp.	<i>Rana pipiens</i> (adult, N) [8], <i>Rana catesbeiana</i> (adult, N) [9], <i>Rana chiricahuensis</i> (adult, N) [39], <i>Rana yavapaiensis</i> (adult, N) [9]	

N natural infection, E experimental infection

1961a, 1963). The wide range of potential paratenic hosts of *Alaria* species is demonstrated in Table 2.

There was a long-standing controversy whether fish could act as paratenic hosts for *Alaria* spp. Leiper (1920) maintained that encysted larvae as recovered from naturally infected fish (African butter catfish, lat. *Schilbe mystus*) developed into *A. alata* when fed to wolves. Pearson (1956) fed mesocercariae of *A. canis* to six goldfish to see whether this fish could act as a paratenic host. Three days p.i., all mesocercariae were found on the viscera in the body cavity in various stages of encapsulation. None was found within the viscera or musculature. Pearson concluded that the mesocercariae made their way into the body cavity of goldfish, where some survived for 2 days, but where all were dead and encapsulated by 3 days. So the observations of Pearson (1956) suggest that, at least, goldfish are unsuitable as paratenic hosts for the mesocercariae of *A. canis*.

Riis et al. (2006) found living encapsulated mesocercariae in the periocular tissues, cornea, sclera, and occasionally the iris of an oyster toadfish (*Opsanus tau*).

Unfortunately, they could not identify the mesocercariae properly. It is, however, well-known, that larvae of the *Diplostomatidae* occasionally infest the lens and the vitreous body of fish eye (Ashton et al., 1969, Hoffmann 1976, Leibovitz et al., 1980). Whether this infestation of the eye can be due to an oral intake of the parasites is contentious.

Moreover, the spectrum of definitive hosts is very broad and includes, depending upon the *Alaria* species, a wide range of carnivores in the respective geographic range. In the literature, numerous descriptions of *A. alata* infections in different canids, felids, and mustelids can be found as summarized in Table 3.

Foster et al. (2008) demonstrated *A. marcianae* mesocercariae in the lungs of three freshly dead Florida panther neonates. The 11-, 12-, and 17-day-old neonates were presumably fed only on milk from the dam since birth. Milk was the only item found in the gastrointestinal tract of these whelps. Mesocercariae and diplostomula of *A. marcianae* were collected from the lungs of the three neonates, indicating a transmammary route of infection.

Table 2 Paratenic hosts of *Alaria* spp. mesocercariae following natural (N) and experimental infection (E) according to literature

<i>Alaria</i> species	Host species (Infection)	References
<i>A. mustelae</i> (Bosma, 1934)	Snakes (N), <i>Mus musculus</i> (House mouse, E), <i>Rattus rattus</i> (Rat, E), <i>Peromyscus leucopus</i> (White-footed Mouse, N), <i>Mustela vison</i> (Am. Mink, N), <i>Procyon lotor</i> (Raccoon, N) [1], <i>Martes pennanti</i> (Fisher, N) [10]	[1] Bosma 1931, [2] Bugge 1942a, [3] Bugge 1942b, [4] Burrows and Lillis 1965, [5] Castro et al., 2008,
<i>A. intermedia</i> (Olivier and Odlaug, 1938)	<i>Thamnophis sirtalis</i> (Garter snake, N) [7], <i>Mus musculus</i> (House mouse, E) [6, 15], <i>Rattus rattus</i> (Rat, E) [15], <i>Felis domestica</i> (Cat) [7]	[6] Cuckler 1940, [7] Cuckler 1941, [8] Cuckler 1949, [9] Cort 1918, [10] Dick and Leonard 1979,
<i>A. marciana</i> (La Rue, 1917)	Snakes (E) [9], <i>Thamnophis sirtalis</i> (Garter snake, N) [10], <i>Thamnophis marciana</i> (N), <i>Thamnophis eques</i> (N) [14], <i>Mus musculus</i> (House mouse, E), <i>Felis domestica</i> (Cat) [7, 8, 9], <i>Leopardus pardalis</i> (Ocelot, N) [18]	[11] Goüy de Bellocq et al., 2003, [12] Kimber and Kollias 2000, [13] La Rue 1917, [14] Morozov 1937,
<i>A. alata</i> (Goeze, 1782)	<i>Tropidonotus natrix</i> (Grass snake, N) [25], <i>Mustela putorius</i> (Ferret, N), <i>Mustela erminea</i> (Stoat, N), <i>Mustela lutreola</i> (Europ. Mink, N), <i>Mustela nivalis</i> (Weasel, N) [14], <i>Mustela lutreola</i> (Europ. Mink, N), <i>Martes martes</i> (Pine marten, N), <i>Martes zibellina</i> (Sable, N) [20], Pig (N), <i>Sus scrofa</i> (Wild boar, N) [2, 22], <i>Meles meles</i> (Badger, N) [3], Cattle (N), <i>Ursus arctos</i> (Brown bear, N) [21], <i>Talpa europaea</i> L. (Mole, N) [24], <i>Vipera berus</i> (Europ. adder, N) [23], <i>Apodemus sylvaticus</i> (Woodmouse, N) [11], <i>Felis domestica</i> (Cat) [5]	[15] Odlaug 1940, [16] Pearson 1956, [17] Pence and Dowler 1979, [18] Pence et al., 2003, [19] Poole et al., 1983, [20] Petrov and Dubnickij 1950a, [21] Staskiewicz 1947,
<i>A. arisaemoides</i> (Augustine and Uribe, 1927)	<i>Thamnophis sirtalis</i> (Garter snake, E), <i>Gallus gallus</i> (Chicken, E), <i>Mus musculus</i> (House mouse, E), <i>Peromyscus maniculatus</i> (Deer mouse, E) [16]	[22] Stefansky and
<i>A. canis</i> (La Rue and Falis, 1934)	<i>Felis domestica</i> (Cat, N) [4] <i>Thamnophis sirtalis</i> (Garter snake, E), <i>Anas boschas</i> (Duck, E), <i>Gallus gallus</i> (Chicken, E), <i>Mus musculus</i> (House mouse, E), <i>Peromyscus maniculatus</i> (Deer mouse, E), <i>Mustela putorius</i> (Ferret, E), <i>Lutra canadensis</i> (Otter, N) [16], <i>Lontra canadensis</i> (North American river otter, N) [12]	Tarczynski 1953, [23] Shimalov et al., 2000c, [24] Shimalov et al., 2001b, [25] Timofeev 1900.
<i>A. taxidea</i> (Swanson and Erickson, 1946)	<i>Martes Americana</i> (Pine marten, N) [19], <i>Taxidea taxus</i> (American badger, N) [17]	

No mesocercariae, diplostomula, or mature *A. marciana* were seen in the stomach or the small intestine. So the dam was assumed to be the definitive host. The probable paratenic host for the *A. marciana* infection in the adult Florida panther is the raccoon (*Procyon lotor*). Several authors already reported about the possibility of a vertical transmission of *Alaria* mesocercarial stages (Pence et al., 1988, Shoop and Corkum 1983, 1984a, b, 1987, Shoop et al., 1990). Shoop and Corkum (1987) assume not-lactating

and male cats to serve as definitive hosts for *Alaria* spp., whereas lactating dams would usually act as a paratenic host (Shoop and Corkum 1987). Yastrebov et al. (2005) demonstrated *A. alata* mesocercariae in the blood of stray cats and dogs. The results of these studies indicate a hematogenous spread of the mesocercarial stage of the parasite and simultaneously point to the fact that even definitive hosts can act as carriers of *Alaria* spp. mesocercarial stages.

Table 3 Prevalence (Prev. %) of carnivore hosts of *Alaria alata* as reported in literature

Host	Country or region	Prev. (%)	Number of parasites (min-max)	Reference	
<i>Canis lupus L.</i> (European wolf)	Poland	2.2	n.g.	Popiołek et al., 2007	
	Estonia	89.0	3–1533	Moks et al., 2006	
	Belarus	17.3	2–150	Shimalov et al., 2000b	
<i>Canis lupus familiaris</i> (dogs)	Greece	2.5	n.g.	Papazahariadou et al., 2007	
	Turkey	5.0	n.g.	Umur 1998	
	Sweden	0.4	n.g.	Jogeland et al., 2002	
<i>Vulpes vulpes L.</i> (Red fox)	Denmark	15.4	n.g.	Saeed et al., 2006	
	Germany	0.1	n.g.	Loos-Frank and Zeyhle 1982	
	Finland	9.6	n.g.	Freeman 1966	
	Sweden	40.6	n.g.	Persson and Christensson. 1971	
	Denmark	26.0	n.g.	Guildal and Clausen 1972	
	Wales	13.0	n.g.	Williams 1976	
	Germany (West Berlin)	28.3	n.g.	Saar 1957	
	Austria	18.4	n.g.	Hinaidy 1976	
	Poland	88.0	n.g.	Kozłowska 1957	
	Poland	76.5	n.g.	Furmaga and Wysocki 1951	
	Yugoslavia	64.5	n.g.	Lozanić 1966	
	Bulgaria	2.1	n.g.	Jančev and Ridjakov 1978	
	Portugal	27.4	n.g.	Eira et al., 2006	
	Netherlands	10.9	–18	Borgsteede 1984	
	Belarus	42.6	2–600	Shimalov et al., 2003	
	Germany (Schleswig-Holstein)	29.7	n.g.	Lucius et al., 1988	
	Ireland	27.3	–308	Wolfe et al., 2001	
	<i>Nyctereutes procyonoides</i> (raccoon dog)	Danube delta	47.4	n.g.	Barbu 1972
		Armut-Primorsker-area	>10	n.g.	Judin 1977
		Germany (eastern)	69.2	n.g.	Schuster et al., 1993
Volga delta		23.5	n.g.	Ivanov and Semenova 2000	
Belarus		42.9	4–800	Shimalov et al., 2002	
<i>Pseudalopex gymnocercus</i> (Pampas fox)	Germany (eastern)	70.0	n.g.	Schuster et al., 1993	
	Brasil	36.4	n.g.	Ruas et al., 2008	
<i>Cerdocyon thous</i>	Brasil	50.0	n.g.	Ruas et al., 2008	
<i>Mustela erminea L.</i> (Stoat)	Belarus	3.3	–500	Shimalov et al., 2001a	
<i>Mustela vison</i> (American mink)	Belarus	6.0	–500	Shimalov et al., 2001c	
<i>Mustela nivalis L.</i> (Weasel)	Belarus	3.2	–500	Shimalov et al., 2001a	
<i>Lutra lutra</i> (European Otter)	Belarus	4.0	–500	Shimalov et al., 2000a	
<i>Lynx lynx</i> (Eurasian lynx)	Poland	n.g.	n.g.	Szczęśna et al., 2008	
Domestic cat	Uruguay	25	5	Castro et al., 2008	

n.g.: not given

Prevalence

As stated above, *A. alata* is reported to be the species of European carnivores. However, recent studies revealed that DMS can also be found in South American carnivores (Castro et al., 2008, Ruas et al., 2008). *Alaria* species are

distributed worldwide (Danijarow 1968, Ljubaschenko and Petrov 1962, Mehlhorn 2008, Schnieder 2006). Mehlhorn (2008) estimated that about 30% of the wild canides in Europe are carriers of *A. alata*. The results of various field studies are listed in Table 3. Variability of prevalence data is high, ranging, for example, in the red fox from 0.1% to

88% as shown in Table 3. *A. alata* is the most frequently described trematode of the raccoon dog (Thiess 2006) with prevalence data ranging from <10 to nearly 70% (Schuster et al., 1993). Moreover, the number of parasites that were found per individual animal varied strongly and ranged from 1 to 1.533 adult helminthes (e.g., Borgsteede 1984, Castro et al., 2008, Moks et al., 2006, Shimalov et al., 2000a, 2001a, b, c, 2002, 2003, Wolfe et al., 2001).

Although only the definitive host of the parasite excretes its contagious eggs, transition of mesocercariae between paratenic hosts is quite common (Odening 1963, Hiepe 1985). High infestation rates can therefore be found particularly in omnivores such as wild boars, which live in areas with high *Alaria* prevalence in the definitive hosts. This is because these animals, besides the obligatory second intermediate hosts, also feed on paratenic hosts such as rodents, reptiles, and amphibians (Dönges 1969).

Generally, a significant prevalence of *A. alata* mesocercariae in wild animal populations can be expected in water-rich areas in which the suitable host species (snails, amphibians, and definitive hosts) are present. Wojcik et al. (2001) demonstrated the dependency between the occurrence of suitable snail and amphibian hosts and the prevalence of *A. alata* mesocercariae in wild boars. The studies were conducted between 1999 and 2001 in two hunting regions. Larval alariosis was only revealed in the boars from one of the studied regions. In this region, the results of the parasitological studies revealed definitive (domestic dogs) and intermediate hosts (snails, *Planorbis planorbis* and *Anisus vortex* as well as frogs: *Rana temporaria* and *Rana terrestris*) to be carriers of *A. alata*. The lack of snail hosts in the other region was interpreted as a possible reason for the absence of the parasite in the boar (Wójcik et al. 2001).

In 2002, first incidental findings of *A. alata* during *Trichinella* inspection in the Perleberg abattoir (Brandenburg, Germany) were reported to one of the authors (KG). The parasite was found in carcasses of two wild boars which were finally judged fit for human consumption (personal communication to KG). Jakšić et al. (2002) demonstrated that 1.8% of 210 wild boar samples from Croatia were positive for *A. alata* mesocercariae. Positive carcasses were judged unfit for human consumption (Jakšić et al., 2002). Große and Wüste (2004, 2006) were the first to publish results on incidental findings of DMS in meat of wild boars during routine *Trichinella* inspection in certain areas of Germany (Brandenburg), indicating a potential health risk to consumers. Whereas the first finding of a mesocercarial stage (April 7, 2003) could not be confirmed by the BfR, the second finding of eight highly motile mesocercariae (October 12, 2003) was clearly identified as *A. alata* by the BfR. The carcasses were declared unfit for human consumption. In 2007, DMS was demonstrated in

0.24% of all *Trichinella* samples in Brandenburg. However, as samples were then pooled, the correct prevalence could not be exactly stated (Große and Wüste 2008). During the examination of other wild animals (reptiles, amphibians, birds, mammals) in Brandenburg, *A. alata* mesocercariae could be demonstrated in a badger (personal communication to KG). The isolated parasite is depicted in Fig. 4.

Detection

In the following, we will concentrate on the methods for detection of mesocercariae in paratenic hosts with respect to the human exposition risk.

All detections of *Alaria* mesocercariae in wild boar meat were incidental background findings during official *Trichinella* inspection, which was and is obligatory for meat of all potential *Trichinella* carriers to be introduced into the human food chain (64/433/EEC, 854/2004/EC). Only official methods for *Trichinella* detection which have been standardized and officially published may be applied (77/96/EEC, 2075/2005/EC). Currently, one reference method and three alternative methods exist which are all based in principal on (a) pepsin/HCl-digestion of muscle tissue, (b) concentration of the digest by sedimentation or filtration, and (c) microscopic examination (2075/2005/EC). A fourth method, the traditional compression method (“trichinoscopy”), where a small muscle sample compressed between to glass slides is directly examined under the microscope, may still be applied in an exceptional case s (2075/2005/EC). It is of some interest that this method, which has



Fig. 4 Four motile *Alaria* mesocercariae and two unspecified nematodes after HCL/pepsin digestion from muscle tissue of a badger (bar conforms 200 μ m)

shown to be of significantly less sensitivity than the digestion methods, is apparently applied with relatively high frequency in some countries/areas of the European Union for *Trichinella* inspection of the meat of wild boars.

Samples for *Trichinella* inspection have to be “free of all fat and fascia” as stated *expressis verbis* in Annex I, Chapter I, No 2 b) and c) of the respective regulation, (EC/

2075/2005). However, *Alaria* mesocercariae show “apparently a high affinity to the host’s adipose tissue” (Odening 1961b). This high affinity to the adipose tissue was first described by Bugge (1942a). As can be seen from Table 4, *Alaria* mesocercariae were detected in all paratenic hosts—in most cases, exclusively (North American river otter, Kimber and Kollias (2000), raccoon and opossum, Shoop

Table 4 Anatomic localization of and detection methods for mesocercariae of *Alaria* spp. in several paratenic host species as described in literature

<i>Alaria</i> sp. / Host	Method	Anatomic location	Author
<i>A. spp.</i> / snakes	Direct	Adipose tissue (“fat body”) – other anatomic locations are not specified by the authors	Cort 1918, Dick and Leonard 1979, Odening 1961b, Pearson 1956, Shoop and Corkum 1981, Shoop et al. 1990
<i>A. canis</i> / North American River Otters (<i>Lontra canadensis</i>)	Direct	Subcutaneous mesenteric fat	Kimber and Kollias 2000
<i>A. marciana</i> / Raccoon (<i>Procyon lotor</i>)	Direct	Subcutaneous mesenteric fat	Shoop and Corkum 1981
<i>A. marciana</i> / Opossum (<i>Didelphis virginiana</i>)	Direct	Subcutaneous mesenteric fat, lungs	Shoop and Corkum 1981
<i>A. marciana</i> / Domestic cat (<i>Felis...</i>)	H	Adult: adipose tissue of mammary gland (mesocercariae) Offspring: lungs (metacercariae), intestines (adult)	Shoop and Corkum 1983
<i>A. marciana</i> / Mice	H	Adult: adipose tissue of mammary gland (mesocercariae)	Shoop and Corkum 1983
<i>A. alata</i> / wild boar (<i>Sus scrofa...</i>)	Direct	Accumulation in abdominal cavity followed by infestation of viscera and adipose tissue	Bugge 1942a
<i>A. alata</i> / wild boar (<i>Sus scrofa...</i>)	TC	Diaphragm (official <i>Trichinella</i> sample side according to 2075/2005/EC)	Jakšić et al., 2002
<i>A. alata</i> / wild boar (<i>Sus scrofa...</i>)	TDp	Diaphragm (official <i>Trichinella</i> sample side according to 2075/2005/EC)	Große and Wüste 2004, 2006
<i>Alaria alata</i> / Rhesus monkey (<i>Macaca mulatta</i>)	Direct	Adipose tissue of heart, pericard, between liver, diaphragm, mesentery between Arteria carotis and oesophagus, subcutaneous adipose tissue of the distal ribs, in the intramuscular connecting tissue of the ribs and in the tendons of shoulder, neck and throat musculature	Odening 1961b
<i>A. marciana</i> / Primates (<i>Callithrix jaccus</i>)	H	Adult female: mammary glands (alveoli in proximity to the nipple), head and neck muscle, anterior body muscle, posterior body muscle, heart lungs Infants: head and neck muscle, anterior body muscle, posterior body muscle, liver, kidneys, heart, lungs, stomach, small intestine	Shoop et al., 1990
<i>A. Americana</i> / <i>Homo sapiens</i>	H	bronchial aspirate, lung tissue, ascitic fluid, liver, heart, kidney, pancreas, stomach, spleen, lymph nodes, fat, brain, spinal cord	Fernandez et al., 1976, Freeman et al., 1976
<i>A. alata</i> / skunk	Direct	Adipose tissue, heart, aorta, kidney, thyroid, below pleura, thoracic cavity, abdominal cavity	Sudarikov 1960
<i>A. alata</i> / hedgehog, wild canides	Direct	Subcutaneous mesenteric fat	Sudarikov 1960
<i>A. alata</i> / otter	Direct	Lungs	Sudarikov 1960
<i>A. alata</i> / mice	Direct	Diaphragm	Sudarikov 1960
<i>A. alata</i> / mole	Direct	Heart, lungs	Sudarikov 1960
<i>A. alata</i> / Domestic cat (<i>Felis...</i>)	Direct	Heart, intercostal muscle	Sudarikov 1960

TD *Trichinella* inspection by digestion, TC *Trichinella* inspection by compression, Direct visual inspection (particular with the aid of a magnifying glass), H histological examination

and Corkum (1981), hedgehog and wild canids, Sudarikov (1960), snakes (e.g. Cort 1918, Dick and Leonard 1979, Odening 1961b, Pearson 1956, Shoop and Corkum 1981, Shoop et al. 1990)—in adipose tissue.

It is highly questionable if a method as optimized for the detection of *Trichinella* in pure muscle tissue can reliably detect *Alaria* mesocercariae which obviously distributes quite differently in its host as shown in Table 4.

Up to 2005, *Trichinella* inspection was by way of derogation from the obligatory ruling—until a common harmonizing rule would be created for so-called “*Trichinella*-free areas”—not necessary in member states which applied for non-inspection on a national level (92/120/EEC). The extent of this derogation from *Trichinella* inspection of fattening pigs reached substantial orders of magnitudes in some member states (Lücker and Hartung 2006). It might be concluded that also a substantial number of wild boars remained unexamined for *Trichinella* and thus for DMS in some European member states. Today, derogation from the obligatory *Trichinella* inspection is possible in the context of so-called “*Trichinella*-freedom” which is under strict official control (i.e., “*Trichinella*-free” farms and “*Trichinella*-free” regions) and only applicable to fattening pigs (2075/2005/EC). For wild animal populations, derogation from obligatory *Trichinella* inspection will be possible, where “the competent authority has ascertained by risk assessment that the risk of *Trichinella* infestation of a particular farmed or wild species is negligible.” Moreover, *Trichinella* inspection of wild game or wild game meat directly supplied to the final consumer or to local retail establishments directly supplying the final consumer falls within the responsibility of the member state s (2075/2005/EC). Thus, future development in *Trichinella* inspection might also contribute to a further increased underestimation of DMS in wild animal populations.

Pathogenicity

For a long time, it was assumed that DMS in wild boars would not imply any risk to consumers (Beutling 2004, Lerche et al., 1957, Ostertag and Schönberg 1955).

In contrast, Odening (1961b) demonstrated by experimentally infecting a primate that *Alaria* mesocercariae can cause severe damages within a paratenic host closely related to humans. Overall pathogenicity is correlated to high infestation densities, in particular, after repetitive intake of mesocercariae. The transition of the mesocercariae from one paratenic host to another fails to decrease infectivity of the parasite (Bosma 1934, Dönges 1969, Hiepe 1985, Lutz 1933a, b, Lutz 1921, Odening 1963, Pearson 1958, Pearson 1956, Schnieder 2006). Since 1973, several reports about human larval alariosis have been published as summarized in Table 5.

It is important that most infections with trematodes are found to be associated with eosinophilia and an increase of IgE (Löscher and Sonnenburg 2005), which means that a general anaphylactic reaction may arise from a repetitive oral intake of infected material. The symptoms of an anaphylactic shock range from tachycardia and drop in blood pressure to vasomotoric collapse and unconsciousness (Bork 1985, Egger 2005).

Human alariosis manifests in various clinical signs which range from low-grade respiratory and cutaneous symptoms to a diffuse unilateral subacute neuroretinitis (DUSN) (Bialasiewicz 2000, Hedges 2000) and to an anaphylactic shock with lethal consequence as mentioned above. Freeman et al. (1976) report on a 24-year-old Canadian male who complained of tightness in the chest and abdominal symptoms after several long hikes across eastern Ontario (Canada). Within 2 days of the initial illness, the patient developed flu-like symptoms like head-

Table 5 Cases of human larval alariosis according to literature

Year	Parasite	Location	N	Manifestation	Infestation route and vector	Author
1969	<i>Alaria</i> (?) mesocercariae (?)	CA, USA	1	Eye	(?), (?)	Byers and Kimura 1974, McDonald et al., 1994
1972	<i>Alaria</i> mesocercariae	Ontario, Canada	1	Eye	Smear infection with the preparation of frog legs	Shea et al., 1973
1975	<i>Alaria Americana</i> mesocercariae	Ontario, Canada	1	Generalized (see Table 3), lethal	NU (frog legs)	Freeman et al., 1976, Fernandez et al., 1976
1975	<i>Alaria</i> mesocercariae	LA, USA	1	Skin	NU (venison, raccoon (?))	Beaver et al., 1977
1988	<i>Alaria</i> mesocercariae	CA, USA	1	Eye	NU (venison) or frog legs (PSI)	McDonald et al., 1994
1990	<i>Alaria Americana</i> mesocercariae	CA, USA	1	Eye	NU (venison) or frog legs (PSI)	McDonald et al., 1994
1993	<i>Alaria Americana</i> mesocercariae	Manitoba, Canada	1	Respiratory tract, skin	NU (wild goose (?))	Kramer et al., 1996

N: cases; (?): unconfirmed, unknown; PSI: possible smear infection; NU: nutritional

aches, fever, faintness, and cough, and on the third day, showing severe dyspnea and hemoptysis, he was admitted to a local hospital. On the fourth day, the patient became comatose, and skin petechiae were evident. The tentative diagnosis was viral pneumonia, and he was treated with broad-spectrum antibiotics. After the treatment failed, biopsy of a skin lesion and an open-lung biopsy were performed. The tissue sections of fixed lung tissue contained lengthwise sections of a fluke which was tentatively identified as *Alaria* spp. mesocercaria. By the ninth day, after initial symptoms, the patient died in the hospital. At autopsy, practically all viscera showed extensive local or diffuse hemorrhage. Several thousand mesocercariae were estimated to have been present within the viscera and nearly all organs. The cause of death was asphyxiation from extensive pulmonary hemorrhage, probably due to immune-mediated mechanisms, after repetitive oral intake of *Alaria Americana* mesocercariae. The possibility that the infective dose of mesocercariae might have been ingested with drinking water was investigated and ruled out. The authors concluded that the victim ate uncooked or more likely inadequately cooked frog legs heavily infected with mesocercariae; however, relatives denied that.

Risk assessment and conclusion

In accordance with the recent assessment of the BfR (2007), which concluded that current methodology and data are insufficient, a sound analysis of consumer exposition risk to *Alaria* mesocercariae is impossible for the time being. However, there is no question about the high potential pathogenicity of this parasite as shown in the previous chapter. Jakšić et al. (2002) and Große and Wüste (2004, 2006) pointed out, that the parasite represents a potential source of infection for both humans and animals and that consumption of wild boar meat can be an important factor for the epidemiology of this zoonosis.

Both alimentary and occupational exposition must be taken into account. As to the latter, the Swiss Federal Office for the Environment (FOEN) categorized *A. alata* as a stage 2 risk (Z) for parasites with zoonotic potential (Anonymous 2003) as pertaining to occupational health risks.

Up to now, only few reports on human larval alariosis exist, and none have been reported in Germany. Keeping the possibly high non-inspection rate of wild boars for *Trichinella* as well as the methodological deficiencies in mind, we must balance this against a presumably low level of awareness of this zoonosis in general and particularly against more or less uncharacteristic symptoms of low level infections. A tendency can be noted for European official meat inspection to treat DMS positive meat of wild boars as

unfit for human consumption, at least on a provisional basis and in favor of consumer protection (BfR 2007, Jakšić et al. 2002).

In conclusion, we can state that the high potential pathogenicity of *Alaria* spp. mesocercariae and their presence in wild game should initiate further studies. They must concentrate on (1) the optimization and/or development of methods of DMS detection, (2) the distribution of the mesocercariae within paratenic hosts (so-called predilection sites), (3) their prevalence in sylvatic populations of wild animals and in the food chain. Further, their tenacity within the paratenic host and meat as pertaining to food technological treatments has to be elucidated. Moreover and in close connection with the parasites' pathogenicity and tenacity, the question whether *Alaria alata* might split up into different species should be elucidated.

Following the publications of incidental findings of *Alaria* mesocercariae in wild boar meat (Große and Wüste 2006) and the statement on the DMS problem by the BfR, the Federal Ministry of Nutrition, Agriculture and Consumer Protection (BMELV, Germany) consequently initiated and funded a study on the detection and prevalence of *Alaria* mesocercariae in wild animal populations. We will present first results of this study in a following paper. They support the conclusions of this review strongly and will supply further prevalence data as well as first results of a preliminary method for the detection of *Alaria* mesocercariae in adipose tissue.

Acknowledgement We gratefully acknowledge the funding of parts of this work by the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection (BMELV, Germany).

For their valuable technical assistance in the present study, we would like to thank Lia Kieker, Heiko Wellner, Lutz Gumpert, Carolin Gladis, and TÄ Katrin Zetzsche. Further, we would like to express our gratitude for helpful scientific input made by Dr. Walentina Holthaus, Dr. Viktor Dyachenko, Dr. Ronald Schmäsche, and in particular Dr. Karsten Nöckler.

References

- Andreas K (2006) Helminthen einheimischer Froschlurche. Vet Diss FU Berlin. Journal-Nr. 3048
- Anonymous (2003) Einstufung von Organismen. Parasiten. Herausgegeben vom Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), Bern
- Department of the Environment, Transport, Energy, and Communications, Federal Office for the Environment (FOEN) <http://www.umwelt-schweiz.ch/imperia/md/content/stobobio/biotech/12.pdf>
- Ashton AN, Brown N, Easty P (1969) Trematode cataract in fresh water fish. J Small Anim Pract 10:471–478
- Baer JG (1951) Ecology of animal parasites. Univ. of Illinois Press, Urbana III, 1951
- Barbu P (1972) Beiträge zum Studium des Marderhundes, *Nyctereutes procyonoides ussuriensis* (Matschie, 1907), aus dem Donaudelta. Säugerk Mitt 20:375–405

- Beaver PC, Little MD, Tucker CF, Reed RJ (1977) Mesocercaria in the skin of man in Louisiana. *Am J Trop Med Hyg* 26(3):422–426
- Beutling DM (2004) Lehrbuch der Schlachttier und Fleischuntersuchung. Parey Verlag Stuttgart 2004; ISBN 3-8304-4098-7:22
- BfR (2007) Bundesinstitut für Risikobewertung Wildschweinfleisch kann den gefährlichen Duncker'schen Muskelegel enthalten. Stellungnahme Nr. 027/2007 des BfR vom 1. Juli 2007
- Bialasiewicz AA (2000) Neuroretinitis. *Ophthalmologie* 97:374–391
- Borgsteede FHM (1984) Helminth parasites of wild foxes (*Vulpes vulpes* L.) in the Netherlands. *Z Parasitenkd* 70:281–285
- Bork K (1985) Kap.12 Soforttyp-Reaktionen. In: Arzneimittelnebenwirkungen an der Haut: Klinik- Diagnostik zur Erkennung der auslösenden Medikamente- Pathogenese- Therapie. 2. Auflage, Schattauer
- Bosma NJ (1931) *Alaria mustelae* sp. nov., a trematode requiring four hosts. *Science* 74:521–522
- Bosma NJ (1934) The life history of the trematode *Alaria mustelae* sp. nov. *Trans Amer Micr Soc* 53:116–153
- Bugge G (1942a) Das sogenannte Muskeldistomum, Agamodistomum suis, ein Bewohner der Bauchhöhle des Schweines. *Tierärztl Rdsch* 48:146–151
- Bugge G (1942b) Der Muskelegel Dunckers beim Frosch. *Zschr Fleisch-Milchhyg* 54:73–76
- Burrows RB, Lillis WG (1965) Trematodes of New Jersey dogs and cats. *J Parasitol* 51(4):570–574
- Byers B, Kimura SJ (1974) Uveitis after death of a larva in the vitreous cavity. *Am J Ophthalmol* 77(1):63–66
- Castro O, Venzal JM, Felix ML (2008) Two new records of helminth parasites of domestic cat from Uruguay: *Alaria alata* (Goeze, 1782) (Digenea, *Diplostomatidae*) and *Lagochilascaris major* (Leiper, 1910) (Nematoda, *Ascrididae*). *Vet Parasitol* . doi:10.1016/j.vetpar.2008.11.019
- Cort WW (1918) The excretory system of *Agamodistomum marcianae* (LaRue), the agamodistome stage of a fork-tailed cercaria. *J Parasitol* 4:130–134
- Cort WW, Brooks ST (1928) Studies of the holostome cercariae from Douglas Lake, Michigan. *Trans Am Microscop Soc* 47:179–221
- Cuckler AC (1940) Studies on the migration and development of *Alaria* spp (Trematoda: *Strigeata*) in the definitive host. *J Parasitol Suppl* 26:36
- Cuckler AC (1941) Morphological and biological studies on certain strigeid trematodes of mammals. Ph.D. Thesis, Univ. of Minnesota, Minneapolis, Minn.
- Cuckler AC (1949) Morphological and biological studies on certain strigeid trematodes of mammals. Summaries of Ph.D. Theses, Univ. of Minnesota, Minneapolis, Minn. 4:45–47
- Danijarow IA (1968) Veterinärenzyklopädie Bd. 1 (russ.). Moskau
- Dick TA, Leonard RD (1979) Helminth parasites of Fisher, *Martes pennanti* (Erleben), from Manitoba, Canada. *J Wild Dis* 15 (3):409–412
- Dönges J (1969) Entwicklungs- und Lebensdauer von Metacercarien. *Z Parasitenkd* 31:340–366
- Dollfus RPh, Chabaud AG (1953) *Distomum musculorum suis* (HJC Duncker, 1896), méso-cercaire d'*Alaria alata* (JAE Goeze, 1782) (Trematoda *Strigeata*) chez un sanglier (*Sus scrofa* L., 1758, Fera). *Ann Parasitol humaine et comparée* 28:352–364
- Duncker HCJ (1881a) Distomeen im Schweinefleisch. *Zschr mikr Fleischschau* 2(3):23–24
- Duncker HCJ (1881b) Muskel-Distomeen. *Zschr mikr Fleischschau* 2 (4):141
- Duncker HCJ (1884) Distomeen im Schweinefleisch *Zschr mikr Fleischschau* 3:39–42
- Duncker HCJ (1896) Die Muskel-Distomeen. *Berl tierärztl Wschr* 24:279–282
- Duncker HCJ (1897) Die Muskel-Distomeen. *Zschr Fleisch-Milchhyg* 7:197–198
- Egger G (2005) Kap 2 Zellen der unspezifischen Abwehr. In: Die akute Entzündung: Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der unspezifischen Immunität. Springer
- Eira C, Vingada J, Torres J, Miquel J (2006) The helminth community of the Red Fox (*Vulpes Vulpes*), in Duans de Mira (Portugal) and its effects on host condition. *Wildl Biol Pract* 2(1):26–36
- Fernandez BJ, Cooper JD, Cullen JB, Freeman RS, Ritchie AC, Scott AA, Stuart PE (1976) Systemic infection with *Alaria Americana* (Trematoda). *Can Med Assoc J* 115:1111–1114
- Foster GW, Kinsella JM, Sheppard BJ, Cunningham MW (2008) Transmammary Infection of free-ranging Florida Panther neonates by *Alaria marcianae* (Trematoda: *Diplostomatidae*). *J Parasitol* 29:1
- Freeman RS (1966) Helminth parasites of the red fox in Finland. *Proc Int Congr Parasitol Rome* (1964):482
- Freeman RS, Stuart PE, Cullen SJ, Ritchie AC, Mildon A, Fernandes BJ, Bonin R (1976) Fatal human infection with mesocercariae of the trematode *Alaria Americana*. *Am J Trop Med Hyg* 25:803–807
- Furmaga S, Wysocki E (1951) Of the helminthofauna of foxes in the Lublin voivodships territory. *Ann Uni M Curie-Sklodowska Sectio DD* 6:97–123
- Gestaldi B (1854) Cenni sopra alcuni nuovi Elminti della *Rana esculenta* con nuove osservazione sul *Codonocephalus mutabilis* (Diesing). Tesi per aggregazione al Collegio della Facolta delle Scienze Fisiche e Matematiche nella R Univ di Torino:25–36
- Goldberg SR, Bursley CR, Cheam H (1998) Helminths of two native frog species (*Rana chiricahuensis*, *Rana yavapaiensis*) and one introduced frog species (*Rana catesbeiana*) (Ranidae) from Arizona. *J Parasitol* 84(1):175–177
- Goldberg SR, Bursley CR, McKinnell RG, Tan IS (2001) Helminths of northern leopard frogs (*Rana pipiens*, *Ranidae*) from North Dakota and South Dakota. *West N Am Naturalist* 61(2):248–251
- Goüy de Bellocq J, Sarà M, Casanova JC, Feliu C, Morand S (2003) A comparison of the structure of helminth communities in the woodmouse, *Apodemus sylvaticus*, on islands and the western Mediterranean and continental Europe. *Parasitol Res* 90:64–70
- Große K, Wüste T (2004) Funde des Duncker'schen Muskelegels bei der Trichinenuntersuchung mittels Verdauungsverfahrens. DVG 45. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets "Lebensmittelhygiene" 28.09-01.10.2004;Garmisch Partenkirchen
- Große K, Wüste T (2006) Der Dunker'sche Muskelegel Funde bei der Trichinenuntersuchung mittels Verdauungsverfahren. *Fleischwirtschaft* 4:106–108
- Große K, Wüste T (2008) Duncker'scher Muskelegel—Risiko für den Verbraucher? 8. Fachtagung Fleisch- und Geflügelfleischhygiene für Angehörige der Veterinärverwaltung 04.03-05.03.2008, Berlin
- Guildal JA, Clausen B (1972) Endoparasites from one hundred Danish red foxes (*Vulpes vulpes*). *Norwegian J Zool* 21:329–330
- Hedges TR (2000) Diffuse unilateral subacute neuroretinopathy. *Principles and practice of ophthalmology clinical practice* 3:2167–2171
- Hiepe TH (1985) Lehrbuch der Parasitologie Bd 3: Veterinärmedizinische Helminthologie. Fischer, Stuttgart, Jena
- Hinaidy HK (1976) A further contribution to the parasite fauna of the red fox, *Vulpes vulpes* (L.), in Austria. *Zentralbl Veterinarmed B* 23(1):66–73
- Hoffmann GL (1976) Parasites of North American freshwater fishes. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, CA, USA
- Ivanov VM, Semenova NN (2000) Parasitological consequences of animal introduction. *Russ J Ecol* 31(4):281–283
- Jakšić S, Sunčica U, Vučemilo M (2002) Nachweis von Mesozerkarien des Saugwurms *Alaria alata* im Wildschweinfleisch. *Z Jagdwiss* 48:203–207

- Jančev J, Ridjakov N (1978) Helminth fauna of the fox (*Vulpes vulpes crucigera*, Bechstein) in north western Bulgaria. *Chelminthologija*, Sofia 4:73–96
- Jogeland M, Raue H, Petersson U (2002) Inventering av invarterparasiter hos hundar i Skane 1999–2000. [Inventory of internal parasites in dogs in Skane 1999–2000]. *Svensk Veterinartidning* 54(13):635–637
- Johnson PTJ, Lunde KB, Ritchie EG, Launer AE (1999) The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. *Science* 284(5415):802–804
- Joyeux Ch, Baer JG (1934) Les hôtes d'attente dans le cycle évolutif des helminthes. *Biol Med Paris* 24(9):482–506
- Judin VG (1977) Enotovidnaja sobaka Primorja i Priamurja (russ.). *Izd Nauka, Moskva*
- Kimber KR, Kollias GV 2nd (2000) Infectious and parasitic diseases and contaminant-related problems of North American river otters (*Lontra canadensis*): a review. *J Zoo Wildl Med* 31(4):452–472
- Komiya Y (1938) Die Entwicklung des Exkretionssystems einiger Trematodenlarven aus Alster und Elbe, nebst Bemerkungen über ihren Entwicklungszyklus. *Parasitol Res* 10(3):340–385
- Kozłowska J (1957) On the knowledge of the helminth fauna of wild and bred foxes. *Acta Parasitol Pol* 5:181–192
- Kramer MH, Eberhard ML, Blankenberg TA (1996) Respiratory symptoms and subcutaneous granuloma caused by mesocercariae: a case report. *Am J Trop Med Hyg* 55:447–448
- Leibovitz L, Riis RC, Georgi M (1980) Digenetic trematode infection. *J Americ Vet Med Ass* 177:40–42
- Leiper RT (1920) Exhibition of lantern-slides illustrating the experimental transmission of some helminth infections. *Proc Zool Soc London III(XXIX):438*
- Lerche M, Goerttler V, Rievel H (1957) *Lehrbuch der tierärztlichen Lebensmittelüberwachung*. Verlag M&H Schaper, Hannover
- Ljubaschenko CJ, Petrov AM (1962) *Krankheiten der Pelztiere*, Moskau
- Loos-Frank B, Zeyhle E (1982) The intestinal helminths of the red fox and some other carnivores in southwest Germany. *Z Parasitenkd* 67(1):99–113
- Löschner T, v Sonnenburg F (2005) Parasitosen. In: *Therapie innerer Krankheiten von Gustav Baumgartner*, 11. Auflage, Springer
- Ložanić BM (1966) Contribution a la connaissance de la faune des helminthes chez le renard de nos regions (*Vulpes vulpes*). *Acta vet Beogr* 16:301–304
- Lucius R, Böckeler W, Pfeiffer AS (1988) Parasiten der Haus-, Nutz- und Wildtiere Schleswig-Holsteins: Parasiten der inneren Organe des Rotfuchses (*Vulpes vulpes*). *Z Jagdwiss* 34:242–255
- Lücker E, Hartung J (2006) Zum Problem der Risikobewertung so tenanted Trichinellen-freier Betriebe und Trichinellen-freier Gebiete. *Proceedings 46. DVG Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene" 2005*, Garmisch-Partenkirchen, DVG Service GmbH, Gießen, ISBN 3-938026-37-5:251–254
- Lutz A (1921) Zur Kenntnis des Entwicklungszyklus der Holostomiden. *Zbl Bakt I Orig* 86:124–129
- Lutz A (1933a) Zur Kenntnis des *Distoma tertracystis* (Gestaldi) und ähnlicher Formen, die fälschlich als Agamodistomum bezeichnet werden. *Mem inst Oswaldo Cruz* 27:50–60
- Lutz A (1933b) Beobachtungen über Brasilianische Dicranocercarien. *Mem inst Oswaldo Cruz* 27:377–402
- Marshall A (1972) *Textbook of Zoology: Invertebrates*. Elsevier, New York
- McDonald HR, Kazacos KR, Schatz H, Johnson RN (1994) Two cases of intraocular infection with *Alaria mesocercaria* (Trematoda). *Am J Ophthalmol* 117:447–455
- Mehlhorn H (2008) *Encyclopedia of parasitology*. Third edition. Springer, Heidelberg
- Moks E, Jõgisalu I, Saarna U, Talvik H, Järvis T, Valdmann H (2006) Helminthologic survey of the wolf (*Canis lupus*) in Estonia, with an emphasis on *Echinococcus granulosus*. *J Wildl Dis* 42(2):359–365
- Morozov FN (1937) Discovery of encysted trematodes in the internal organs of polecats (russ.). *Trudy Gor'kovsk Gosudarst Pedagog Inst* 1:115–120
- Nikitina EN (1986) Trematode larvae in snails of Lake Glubukoe. *Hydrobiologia* 141:139–141
- Odening K (1960) Studien an Trematoden aus Schlangen, Vögeln und Säugetieren. *Monatsbericht der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin* 2(7):437–455
- Odening K (1961a) Zur Kenntnis des Exkretionssystems einiger Digenetischer Trematoden (Unterordnungen *Plagiorchiata*, *Brachylaemata*, *Strigeata*). *Z Parasitenkd* 204:440–456
- Odening K (1961b) Der „Dunckersche Muskelegel“ kann experimentell auf den Affen übertragen werden. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 16:395–399
- Odening K (1963) Zur Diagnostik der Mesocercarie von *Alaria alata*, eines möglichen Parasiten des Menschen in Europa, an Hand experimenteller Befunde beim Affen. *Mber Dtsch Akad Wiss Berlin* 5:385–390
- Odlaug TO (1940) Morphology and life history of the trematode *Alaria intermedia*. *Trans Am Microscop Soc* 59:490–510
- Olivier L, Odlaug TO (1938) A new mesocercaria (Trematoda: *Strigeata*) with a note on its further development. *J Parasitol* 24:369–374
- Ostertag R v, Schönberg F (1955) *Lehrbuch der Schlachtier- und Fleischuntersuchung*. Enke, Stuttgart
- Papazahariadou M, Founta A, Papadopoulos E, Chliounakis S, Antoniadou-Sotiriadou K, Theodorides Y (2007) Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, Northern Greece. *Vet Parasitol* 148(2):170–173
- Pearson JC (1956) Studies of the life cycles and morphology of the larval stages of *Alaria arisaemoides* (Augustine and Uribe, 1927) and *Alaria canis* (LaRue and Fallis, 1936) (Trematoda: *Diplostomatidae*). *Can J Zool* 34:295–387
- Pearson JC (1958) Observations on the morphology and life cycle of *Strigea elegans* (Chandler & Rausch, 1947) (Trematoda: *Strigeidae*). *J Parasitol* 45(2):155–174
- Pence DB, Dowler RC (1979) Helminth parasitism in the Badger (*Taxidea taxus*) from the western Great Plains. *USA Proc Helminthol Soc Wash* 46:245–253
- Pence DB, Knowlton FF, Windberg LA (1988) Transmission of *Ancylostoma caninum* and *Alaria marcianae* in coyotes (*Canis latrans*). *J Wildl Dis* 24(3):560–563
- Pence DB, Tewes ME, Laak LL (2003) Helminths of the Ocelot from Southern Texas. *J Wildl Dis* 39(3):683–689
- Persson L, Christensson D (1971) Endoparasites of foxes in Sweden. *Zool Revy* 33:17–28
- Petrov AM, Dubnickij AA (1950b) Die Metazerkarien-Alariose der Zobel (russ.). *Trudy vsesojuznogo Instituta Gel'mintologii im Akad K I Skrjabina* 4:20–22
- Petrov AM, Dubnickij AA (1950a) Sables–metacercarial alariosis (russ.). *Karakulevodstvo I Zverovodstvo* 3:70–71
- Poole BC, Chadee K, Dick TA (1983) Helminth parasites of Pine Marten, *Martes Americana* (Turton), from Manitoba, Canada. *J Wildl Dis* 19(1):10–13
- Popiołek M, Szczesna J, Nowaka S, Mysłajeka RW (2007) Helminth infections in faecal samples of wolves *Canis lupus* L. from the western Beskidy Mountains in southern Poland. *J Helminthol* 81(4):339–344
- Potekhina LF (1951) The life cycle of *Alaria alata* and alariosis in foxes and dogs (russ.). *Doklady Akad Nauk SSSR* 76:325–327
- Riis RC, Georgi ME, Leibovitz L, Smith JS (2006) Ocular metacercarial infection of the oyster toadfish, *Opsanus tau* (L.). *J Fish Dis* 4(5):433–435
- Roberts L, Janovy Jr J (2000) *Foundations of Parasitology* (sixth edition). New York (2000), McGraw-Hill

- Ruas JL, Müller G, Farias NA, Gallina T, Lucas AS, Pappen FG, Sinkoc AL, Brum JG (2008) Helminths of Pampas fox, *Pseudalopex gymnocercus* (Fischer, 1814) and of Crab-eating fox, *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) in the South of the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 17(2):87–92
- Ruszkowski J (1922) Die postembryonale Entwicklung von *Hemistomum alatum* Dies. auf Grund experimenteller Untersuchungen. *Bull Intern Acad Polon Sci Classe Sci Math Nat Sér B*, pp 237–250
- Saar C (1957) Parasitologische Untersuchungen beim Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) im Raum von West-Berlin. *Vet Diss FU Berlin* (1957)
- Saeed I, Maddox-Hyttel C, Monrad J, Kapel CM (2006) Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Vet Parasitol* 139(1–3):168–179
- Savinov VA (1953a) Die Besonderheiten der Entwicklung von *Alaria alata* (Goeze, 1782) im Körper des End- und des Reservewirtes (russ.). *Raboty po Gel'mintologii k 75-letiju Akad K I Skrjabinina*, pp 611–616
- Savinov VA (1953b) Die Entwicklung von *Alaria alata* (Goeze, 1782) im Körper der Hunde (russ.). *Trudy vsesojuznogo Instituta Gel'mintologii im Akad K I Skrjabinina* 5:63–64
- Savinov VA (1954) Zu Frage einiger Besonderheiten der Stadienentwicklung der *Strigeata* und der Rolle der verschiedenen Wirte in dieser Entwicklung (russ.). *Učen Zap vologodsk ped Inst* 15:245–306
- Schnieder T (2006) Veterinärmedizinische Parasitologie, Begr. v. Josef Boch u. Rudolf Supperer. 6. Auflage, Parey bei MVS
- Schuster R, Schierhorn K, Heidecke D, Ansorge H (1993) Untersuchungen zur Endoparasitenfauna des Marderhundes *Nyctereutes procyonoides* (Gray, 1834) in Ostdeutschland. *Beitr Jagd Wildforschung* 18:83–87
- Shea M, Maberley AL, Walters J, Freeman RS, Fallis AM (1973) Intraretinal larval trematode. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 77(6):784–791
- Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV (2000a) Helminth fauna of otter (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res* 86(6):528
- Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV (2000b) Helminth fauna of the wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res* 86(2):163–164
- Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV (2000c) Helminth fauna of Snakes (Reptilia, Serpentes) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res* 86:340–341
- Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV (2001d) Helminth fauna of the stoat (*Mustela erminea* Linnaeus, 1758) and the weasel (*M. nivalis* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res* 87(8):680–681
- Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV (2001a) Helminth fauna of the European mole (*Talpa europaea* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res* 87(9):790–791
- Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV (2001b) Helminth fauna of the American mink (*Mustela vison* Schreber, 1777) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res* 87(10):886–887
- Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV (2001c) Helminth fauna of toads in Belorussian Polesie. *Parasitol Res* 87(10):84
- Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV (2002) Helminth fauna of the racoon dog (*Nyctereutes procyonoides* Gray, 1834) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res* 88(10):944–945
- Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV (2003) Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in southern Belarus. *Parasitol Res* 89(1):77–78
- Shoop WL, Corkum KC (1981) Epidemiology of *Alaria marcianae* mesocercariae in Louisiana. *J Parasitol* 67(6):928–931
- Shoop WL, Corkum KC (1983) Transmammary infection of paratenic and definitive hosts with *Alaria marcianae* (trematoda) mesocercariae. *J Parasitol* 69(4):731–735
- Shoop WL, Corkum KC (1984a) Transmammary infection of newborn by larval trematodes. *Science* 223(4640):1082–1083
- Shoop WL, Corkum KC (1984b) Pathway of mesocercariae of *Alaria marcianae* (Trematoda) through the mammary glands of lactating mice. *J Parasitol* 70(3):333–336
- Shoop WL, Corkum KC (1987) Maternal transmission by *Alaria marcianae* (Trematoda) and the concept of amphiparatenesis. *J Parasitol* 73(1):110–115
- Shoop WL, Font WF, Malatesta PF (1990) Transmammary transmission of mesocercariae of *Alaria marcianae* (Trematoda) in experimentally infected primates. *J Parasitol* 76(6):869–873
- Staskiewicz RBS (1947) *Studia nad Agamodistomum muscolorum suis*. *Med Weterynar (Poland)* 31:28–31
- Stefański W, Tarczyński S (1953) Sur le développement de l' *Agamodistomum suis* Duncker, 1881. *Acta Parasitol Polonica* 1:149–154
- Sudarikov WE (1960) In: Skrjabin KI Trematodes of animals and man, essentials of trematodology. *Ac Sci USSR Helm Lab, Moscow* (1960), Israel program f. sci. transl. (1965)
- Thiess A (2006) Untersuchungen zur Helminthenfauna und zum Vorkommen von *Trichinella* sp. beim Marderhund (*Nyctereutes procyonoides*) in Brandenburg. *Vet Diss FU Berlin*
- Timofeev NE (1900) Les trématodes des amphibiens et reptiles des environs de Kharkov. *Trav soc naturalistes Univ imp Kharkov* 24:137–166
- Umur Ş (1998) Bir köpekte *Alaria alata* olgusu. *Tr J of Veterinary and Animal Sciences* 22:89–92
- Wallace FG (1939) The life cycle of *Pharyngostomum cordatum* (Diesing) Ciurea (Trematoda: Alariidae). *Trans Am Microscop Soc* 58:49–61
- Williams BM (1976) The intestinal parasites of the red fox in south west Wales. *Br Vet J* 132(3):309–312
- Wirkerhauser T (1980) Trichinellose, ein altes Problem in neuem Gewand. *Veterinärstation*:3–4
- Wójcik AR, Grygon-Franckiewicz B, Zbikowska E (2001) The studies of the invasion of *Alaria alata* (Goeze, 1782) in the Province of Kuyavia and Pomerania. *Wiad Parazytol* 47(3):423–426
- Wojcik AR, Grygon-Franckiewicz B, Zbikowska E (2002) Current data of *Alaria alata* (Goeze, 1782) according to own studies. *Medycyna Weterynaryjna* 58(7):517–519
- Wolfe A, Hogan S, Maguire D, Fitzpatrick C, Vaughan L, Wall D, Hayden TJ, Mulcahy D (2001) Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Ireland as hosts for parasites of potential zoonotic and veterinary significance. *Vet Rec* 149:759–763
- Yastrebov VB, Gorokhov VV, Shestakov AM (2005) To the detection of the trematode mesocercariae *alaria alata* in the blood of domestic dogs and cats (russ.). *Medicina Moskva* 4:48–51

Cited legal texts

- 77/96/EEC Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to public health—Detection of *Trichinella spiralis* in pork with a pooled sample digestion method using a magnetic stirrer and two separatory funnels—22 June 1998. *Off. J. Eur. Commun. N L026 of 31/01/1977:0067*

64/433/EEC Council Directive 64/433/EEC of 26 June 1964 on health problems affecting intra-Community trade in fresh meat. Off. J. Eur. Commun. N B121 of 29/07/1964:2012

92/120/EEC Council Directive 92/120/EEC of 17 December 1992 on the conditions for granting temporary and limited derogations from specific Community health rules on the production and marketing of certain products of animal origin. Off. J. Eur. Commun. N L062 of 15/03/1993:0086

2075/2005/EC Commission Regulation (EC) No 2075/2005 of 5 December 2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat.

854/2004/EC Regulation (EC) No 854/2004 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 29 April 2004 laying down rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption

A novel detection method for *Alaria alata* mesocercariae in meat

Katharina Riehn · Ahmad Hamedy · Knut Große ·
Lina Zeitler · Ernst Lücker

Received: 26 February 2010 / Accepted: 18 March 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract *Distomum musculorum suis* (DMS), the mesocercarial stage of the trematode *Alaria alata*, can cause severe damages within their hosts, and since several reports about cases of human larval alariosis have been published, it became apparent that infected game animals and in particular wild boars are a potential source of infection for both humans and animals. A final statement concerning the health risks for consumers could not be given due to the lack of information about both the prevalence of DMS and the suitability of *Trichinella* inspection methods to detect this parasite in wild boar meat. Our studies concentrate on (1) the verification of suitability of the official digestion methods for *Trichinella* spp. for DMS detection in wild boars, (2) development, optimization, and validation of methods, and (3) the distribution of the parasites within their paratenic hosts. A total of 868 individual samples/digests from 48 wild boars were analyzed by the reference method for *Trichinella* detection in meat samples according to regulation (EC) No. 2075/2005. In addition to the official protocol, a method modification with Pankreatin© and bile acid was applied for analysis of adipose tissue samples ($n=$

89). On the basis of our results, a new detection method based on a larvae migration technique was developed and used for detection of DMS in 574 single samples. Furthermore, the distribution patterns of DMS in wild boars in a total of 1377 single sample migrations/digestions from 35 positive animals were analyzed by application of all three methods. The official digestion method for *Trichinella* spp. in wild boars meat is inapplicable for the detection of *A. alata* mesocercariae as it shows shortcomings in both digestion and sampling. A direct comparison between the newly developed *A. alata* mesocercariae migration technique and the official digestion method for *Trichinella* spp. based on 574 single samples from 18 animals clearly shows that the sensitivity to detect *A. alata* developmental stages in tissues of wild boars of the new method is nearly 60% higher compared with the magnetic stirrer method for pooled sample digestion as laid down in regulation (EC) No. 2075/2005. Among other advantages, this method offers a simple, highly applicable, fast, and cost effective way to detect DMS in wild boars which is already applicable in routine veterinary inspection.

K. Riehn (✉) · A. Hamedy · L. Zeitler · E. Lücker (✉)
Institute of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Leipzig,
Leipzig, Germany
e-mail: riehn@vetmed.uni-leipzig.de
e-mail: luecker@vetmed.uni-leipzig.de

K. Große
Stadt Brandenburg an der Havel Gesundheits,
Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt,
Klosterstraße 14,
14770 Brandenburg an der Havel, Germany

Introduction

An increasing number of findings of *Alaria alata* mesocercariae in meat of wild boars during official meat inspection and reports on human cases of alariosis initiated a reassessment of the potential foodborne human health risk (BfR 2007; Große and Wüste 2004; Moehl et al. 2009). In its statement, the German Federal Institute for Risk Assessment (BfR) pointed out that a human risk could not

be precluded and that a suitable method for the detection of this parasite was missing (BfR 2007). In view of the insufficient data, a final risk assessment could not be performed, which lead to a preliminary recommendation to declare carcasses of wild boars found to be infested by *A. alata* mesocercariae during official inspection for *Trichinella* spp. unfit for human consumption.

Although the detection of adult *A. alata* is well standardized (e.g. Bridger and Whitney 2009; Bagrade et al. 2009; Papazahariadou et al. 2007; Popiołek et al. 2007; Szczesna et al. 2008), a specific detection method for *A. alata* mesocercariae in meat is unavailable. In the beginning, these encysted parasites, especially on the serous membranes, were identified by the naked eye or with a magnifying glass (Hiepe 1985; Odening 1960, 1963). Hemmert-Halswick and Bugge (1934) pointed out that encysted larvae only occur on muscle surfaces. Mesocercariae, which are located within the muscular tissue, show no surrounding cyst or capsule. The combination of microscopy and compression of small muscle samples between a pressure glass for the detection of *Distomum musculorum suis* (i.e. *A. alata* mesocercariae, in the following abbreviated as “DMS”) in pigs was first described by Duncker (1881) and was applied within a number of further studies (e.g. Agerth 1915; Bugge 1942; Hall 1924; Hemmert-Halswick and Bugge 1934). Trichinoscopy was the only available method for *Trichinella* detection until the pooled digestion method was introduced in the 1970s. This method is replacing trichinoscopy, but the compression method is still applied, e.g. by Jacšić et al. (2002), for the detection of DMS. They demonstrated that 3 (1.8%) of 210 tested wild boars in Croatia were positive for DMS by use of the compression method. In contrast, other studies showed up to 91% of wild boars from Croatia to be positive using the digestion method (Marinculic 2007; Pozio 2010, personal communication).

The vastly differing biology of *Trichinella* and *A. alata*—in particular infestation mode and resulting predilection sites—suggests that the official digestion methods for *Trichinella* spp. as laid down by regulation (EC) No. 2075/2005 (EC 2005) might be inadequate for DMS detection or, at least, be the cause of false-negative results on a so far undefined level (Moehl et al. 2009). This hypothesis is strongly supported by reports from official *Trichinella* inspection where this method was unable to detect *A. alata* mesocercariae in any sample of the individual animals after positive results had been obtained in the respective pooled samples (Große and Wüste 2006).

Here we show that the official digestion method for *Trichinella* spp. is definitely unsuitable for *A. alata* mesocercariae detection in meat and present a new method for the identification of this potentially pathogenic parasite within the body tissues of wild boars.

DMS detection by official *Trichinella* inspection methods (TIM)

In our studies on DMS in wild boars, we originally tested the reference method for *Trichinella* detection in meat samples (in the following, abbreviated as *Trichinella* inspection method, or “TIM”) as stipulated in Annex I, Chapter I of the regulation (EC) No. 2075/2005 (EC 2005). This method is based on a 30 minute artificial HCl/pepsin digestion with concentrations of 8 ± 0.25 ml of 25% hydrochloric acid and 5 ± 0.1 g pepsin (2 000 FIP) per 1 liter of water at 46 to 48°C, followed by a 30 minute sedimentation and examination of the sediment by stereomicroscope.

So far we examined the carcasses of 48 wild boars in 868 individual samples/digests using TIM, which accounts for the whole of the carcasses’ muscle tissue and some further material/sampling sites in each wild boar. In all animals, samples were taken from 14 anatomically defined sites: pillar of the diaphragm, tongue, masticatory muscles (*Mm. masseter, temporalis, pterygoidei*), “cheek” (i.e. various tissues in the caudoventral region of the head containing among others muscle, connective, adipose, glandular, and lymphatic tissue), neck, distal foreleg, shoulder, intercostal muscle, loin, back, abdominal muscles (*Mm. rectus abdominis, obliquus externus and internus abdominis, transversus abdominis*), haunch, distal hind leg, and subcutaneous adipose tissue. In addition, we were able to sample additional material in some cases where the carcasses were not already disembowelled as follows (with the number of respective carcasses given in brackets): larynx with annexed connective tissue (2), oesophagus (2), peritoneum with retroperitoneal adipose tissue (3), *omentum majus* (1), heart (10), liver (10), spleen (3), kidney (7), and lungs (9). Sample sizes ranged from 11.6 to 125 g, resulting from the differing availability of the respective tissues. Thirty-eight wild boars originated from local veterinary inspection offices. In 34 of these cases, DMS was demonstrated in the diaphragm during official inspection; 4 animals were negative for DMS and judged unfit for human consumption for other reasons. In addition, 10 animals that died in consequence of traffic accidents were delivered directly to our laboratory. All carcasses and sample materials were stored at +2°C until dissection, e.g. preparation and examination, which was performed within 24 hours.

Twenty-five (73.5%) of the originally 34 DMS-positive wild boars—mainly in the diaphragm—were verified in our laboratory, whereas in 9 animals (26.5%), it was not possible to confirm the positive report as given by the local authorities, even though we digested the whole muscle tissue of each individual carcass using TIM. The four animals that were tested negative for DMS by the competent veterinary inspection office were also negative

in our laboratory and all of the ten animals that died in consequence of traffic accidents delivered a negative result for DMS by TIM. In-house analyses showed that the number of DMS as detected in the positive samples varied strongly, ranging from 1 to 133 in samples from 11.6 to 125 g (0.03–20.1 DMS/100 g). The arithmetic mean of all samples was 1.88, the median 0.28, and the standard deviation 4.47 DMS/100 g.

***A. alata* mesocercariae migration technique (AMT)**

In addition to the protocol for TIM as specified in Annex I, Chapter I, No. 3 of the regulation (EC) No. 2075/2005, we tested various modifications of this method in order to optimize its efficiency to detect DMS. One particular modification was based on the reported affinity of DMS to adipose tissue (Moehl et al. 2009). We developed a method in which Pankreatin© and bile acid in a magnetic stirrer apparatus were used for the digestion of adipose tissue with and without additional HCl/pepsin supplements. Even though a maximum of only 10% to 15% of the sample material was actually digested, the number of DMS we retrieved from samples was increased in some cases as compared with TIM, which was performed in parallel with a representative aliquot of the respective samples (data not shown). Visualization by stereomicroscope demonstrated that these parasites moved actively from the sample material into surrounding liquid and that the isolated DMS were very motile, whereas DMS retrieved in parallel by TIM showed a distinctly decreased vitality, or were dead. This affinity of DMS for liquids was also documented in literature (Bugge 1942; Duncker 1884, 1896; Freeman et al. 1976; Pearson 1956).

Based on the observations that the parasite (1) shows a high affinity to liquids and (2) moves actively out of the tissues, we were able to develop an alternative method based on a larvae migration technique. The experimental setup is basically comparable with the so-called Baermann technique (“Baermanization”) for nematodes. The method was first described by Baermann (1917), who extracted *Ancylostoma* larvae from soil. Later it was modified and applied for the detection of numerous further nematode species from different matrices such as grass and feces (Cort et al. 1922; Dinaburg 1942; Pillmore 1958, 1959; Todd et al. 1970).

As this detection method for the trematode mesocercariae of *A. alata* in different body tissues of wild boars is provided for legal use after validation, an operating procedure was developed and is displayed in Table 1. In order to minimize analytical variance which might be caused by the pronounced heterogeneous distribution of DMS (see below), we recommend aliquots of 5 g each of

roughly homogenized tissue samples from different preferable sampling sites (see Table 1: 2.3), which should together constitute the final specimen (30 g). The sample material was chopped manually into pieces of approx. 0.5 cm edge length. First tests have shown that the degree of grinding has no or only a minor influence on the number of isolated DMS. Uncut samples of 30 g as well as manually chopped samples of 0.2–0.5, 1.0–1.5, and 2.0–2.5 cm of edge length were tested, and no substantial differences could be observed.

The necessary equipment includes a glass funnel fixed in a stand, a rubber hose connected to the funnel bottom, and a clamp attached to the tube, approximately 10 cm below the funnel. The prepared sample material is transferred to a plastic sieve placed in the funnel and immersed in warm tap water (46–48°C, cooling to room temperature). Application of other liquids such as Ringer’s solution, lactated Ringer’s solution, normal saline, and glucose 5% solution did not increase but actually decrease the number of retrieved larvae. Following migration/sedimentation, 20 ml sample fluid is quickly run off into a measuring cylinder and poured into a Petri dish. Afterwards, the fluid sample is examined by use of a trichinoscope or stereomicroscope at a magnification of 15 to 20 times. The duration for migration/sedimentation of 90 minutes as applied in our study (see Table 1) was later shown to be reducible to 30 minutes without notable losses in the number of isolated DMS. Under the given conditions, more than 95% of the DMS were detected within the first 30 minutes, whereas after additional 30, 60, and 210 minutes, only in some cases and only single larvae were demonstrated in the remaining liquid. However, we recommend applying the original 90 minutes until further data back up these preliminary findings.

In recovery experiments, DMS were put on the top of the chopped meat within the funnel. So far, we recovered 100% of mesocercariae in all cases. The *A. alata* mesocercariae migration technique (in the following, abbreviated as “AMT”) takes advantage of the specific and pronounced mobility of DMS, its ability to actively move from the sample, and its inability to swim against gravity. The warm liquid stimulates the migration of the larvae as they will move actively into the free liquid. As soon as the mesocercariae have moved out of the sample material, they sink gradually in an appreciable body of water within which there is no surface tension.

Application of AMT and comparison with TIM

Up to date, we examined 574 single samples from 18 animals by use of AMT as specified in Table 1. Altogether 522 individual samples from 16 animals (83.3%) were

Table 1 AMT—operating procedure for the detection of *Alaria* spp. mesocercariae in different body matrices of wild boars

1 Equipment	1.1 Knife or scissors and tweezers 1.2 Cutting board 1.3 Stands, rings, and clamps or multiple funnel stand 1.4 Glass funnel, Ø 10 cm 1.5 Plastic sieves, Ø 9 cm, mesh size 0.8 mm 1.6 Rubber hose, Ø 10 mm, 10 cm long 1.7 Hose clamp, 60 mm 1.8 50 ml glass measuring cylinders 1.9 A trichinoscope with a horizontal table or a stereomicroscope 1.10 Petri dishes, Ø 9 cm, marked on their undersides into 10 × 10 mm squares 1.11 Larval counting basin according to Regulation EC No. 2075/2005, Annex I, Chapter I, No. 1 (m) 1.12 Tap water heated to 46 to 48°C cooling down to room temperature 1.13 Balance accurate to at least 0.1 g
2 Samples / Sampling	2.1 For wild boar carcasses, a sample weighing at least 30 g containing muscle tissue, adipose tissue, connective tissue, and glandular tissue is to be taken. 2.2 It is recommended to take aliquot tissue samples (approx. 5 g each) from preferably different sampling sites (n=6) added together for a 30 g specimen. 2.3 Suitable tissues: “cheek” (i.e. various tissues in the caudoventral region of the head containing among others muscle, connective, adipose, glandular, and lymphatic tissue), peritoneum with retroperitoneal adipose tissue, pillar of the diaphragm, larynx with annexed connective tissue, tongue, and masticatory muscles (<i>Mm. masseter, temporalis, pterygoidei</i>)
3 Proceeding	3.1 The glass funnels are supported on the funnel stands. 3.2 The rubber hose is fitted to the funnels stem and closed with a clamp. 3.3 The sieve is placed in the funnel. 3.4 An aliquot of 30 g of the sample material is roughly chopped (0.5 cm edge length). 3.5 The chopped meat is transferred to the sieve and 150 ml of lukewarm tap water is filled in the funnel. The sample material has to be totally emerged in the water. 3.6 The sample is allowed to stand for 90 min at room temperature. 3.7 After 90 min (see text), a 20 ml sample of fluid is quickly run off into the measuring cylinder and transferred to larval counting basin/Petri dish. 3.8 The cylinder or centrifuge tube is rinsed with not more than 10 ml of tap water, which has to be added to the sample. The sample is examined by trichinoscope or stereomicroscope at a magnification of 15 to 20 times. 3.9 In all cases of suspect areas or parasite-like shapes, higher magnifications of 60 to 100 times must be used.

tested positive for DMS. The number of larvae as detected in the positive tissues ranged from 1 to 77, which equals 0.01 to 44.9 DMS/100 g. The arithmetic mean of all samples was 5.95 DMS/100 g, the median 0.65, and the standard deviation 12.97 DMS/100 g.

For method comparison, sample material from 18 wild boars was chopped, thoroughly mixed, and sectioned into appropriate aliquots, 60 g for TIM and 2 × 30 g for AMT. One hundred eighty-six of these tissue samples were tested by both methods in parallel.

TIM yielded 27 positive out of 186 samples, ranging from 0.6 (minimum) to 224 (maximum) DMS/100 g. The arithmetic mean was 4.4 and the standard deviation was 20.5 DMS/100 g, whereas AMT detected 65 positive samples, ranging from 0.2 (minimum) to 193 (maximum) DMS/100 g (arithmetic mean 9.6; SD 28.8 DMS/100 g). As shown in Table 2, AMT revealed 38 positive samples that

went undetected by application of TIM only, which means 58.5% false negatives for the official method. In contrast, all samples found positive with TIM were also detected to be infested by AMT.

We hypothesized that the high amount of false-negative samples during TIM could be associated with an impairment of DMS during HCl/pepsin digestion, as low survival

Table 2 TIM efficiency/quality as judged by AMT results

	AMT +	AMT -	Total
TIM +	27	0	27
TIM -	38	121	159
Total	65	121	186

TIM *Trichinella* inspection method; *AMT* *Alaria* mesocercariae migration on technique

rates and loss of motility of the mesocercariae hamper a correct diagnosis, and DMS had shown a distinctly higher vitality after lipid digestion. To confirm this, sample material from highly positive animals was digested by TIM. Following digestion with TIM, the sieve was transferred to an AMT-funnel filled with warm tap water. This test setup was allowed to stand for 90 minutes. In the TIM digestion sediments, only dead and partly decomposed DMS could be identified by stereomicroscopic examination, whereas by AMT, only living DMS (100%) were recovered in aliquots of the respective samples. In addition, we were able to retrieve living DMS from the sieves used in TIM of the respective samples where only dead DMS were diagnosed in the sediments. Isolated DMS as recovered from AMT died when put into contact with HCl/pepsin as shown in Fig. 1. They lost their characteristic motility and their morphologic structures soon after exposition and started to degenerate after only 15 minutes. After 90 minutes, DMS began to dissolve. Note that conditions as used in this experiment did not include warming and stirring of the digestion fluid. Thus, one must expect that when using TIM, the DMS loss is even faster and more pronounced.

Using AMT, TIM, and lipid digestion, the distribution patterns of DMS in wild boars in a total of 1377 single sample migrations/digestions from 35 positive animals were analyzed as shown in Fig. 2. The main results as pertaining to the detection techniques were as follows: (1) DMS distributes heterogeneously within the paratenic host, (2) DMS shows a differing distribution pattern in comparison with *Trichinella*, and (3) DMS also prefers localizations with considerable amounts of intermuscular/intramuscular connective and adipose tissue as well as glandular tissue and cartilage.

Discussion

A steadily increasing number of incidental findings of *A. alata* mesocercariae in meat of wild boars during official *Trichinella* inspection underlines the demand for a reliable and feasible method for the detection of DMS in meat. In 2007, the BfR stated that an appropriate diagnostic method

for detection of DMS should be developed in order to acquire further information about the occurrence and the importance of the parasite in Germany (BfR 2007). This applies in particular to wild boars that originate from water-rich areas in which the suitable host species (snails, amphibians, and definitive hosts) are present. As a specific detection method for *A. alata* mesocercariae in meat was unavailable, we used the reference method for *Trichinella* detection in meat samples (TIM) for the detection of DMS. However, during our studies, some doubts about the applicability of this detection method emerged. In 9 (26.5%) out of 34 positive wild boars from local veterinary inspection offices, the positive preliminary report for *Alaria* mesocercariae could not be confirmed in our laboratory by TIM, even though the whole carcasses of the wild boars were dissected and 727 single samples were digested. This low repeatability of positive results is also reported by local authorities; in many cases, it is not possible to target the individual DMS-positive animal within a positive pooled sample (Große and Wüste 2006; Kaufhold 2010, personal communication; Lange 2010, personal communication; Mann 2010, personal communication). TIM has been specially adapted and optimized for the detection of *Trichinella* spp. and is obviously not transferrable one-to-one to the detection of a parasite with a completely differing biology. Objections in principle relate to both sampling sites and methodology.

Our results show that DMS distributes heterogeneously throughout the body of its paratenic host. The parasites could be detected in all 14 preassigned regular sampling sites, as well as in the 8 additional locations. In contrast, *Trichinella* shows a well-defined distribution pattern; the larvae travel through the blood stream, from which they exit through capillaries and accumulate in the muscular fibres. The infested muscle groups are primarily influenced by host species and secondly by age and level of infection. In wild boars, *Trichinella* spp. preferentially accumulate in the diaphragm, the tongue, and the upper fore limb (Kapel et al. 2005). In this context, specimens have to be taken from the foreleg, tongue, or diaphragm of wild boar as stipulated in Annex III (a) of the regulation (EC) No. 2075/2005.

Although a hematogenous spread in the paratenic host is not precluded completely in case of DMS, a clear proof is

Fig. 1 *Alaria* spp. mesocercariae in direct contact with 5 ml HCl/pepsin digestion fluid taken from a pooled sample digestion for *Trichinella* detection in meat samples acc. to Annex I, Chapter I of the regulation (EC) No. 2075/2005. The mesocercariae within the fluid sample were not exposed to a heat source

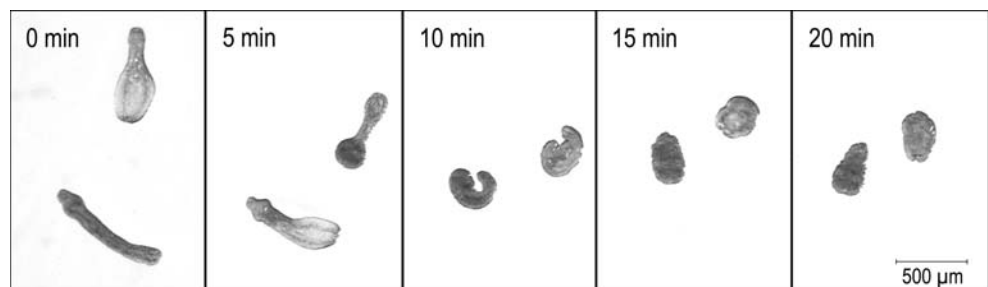
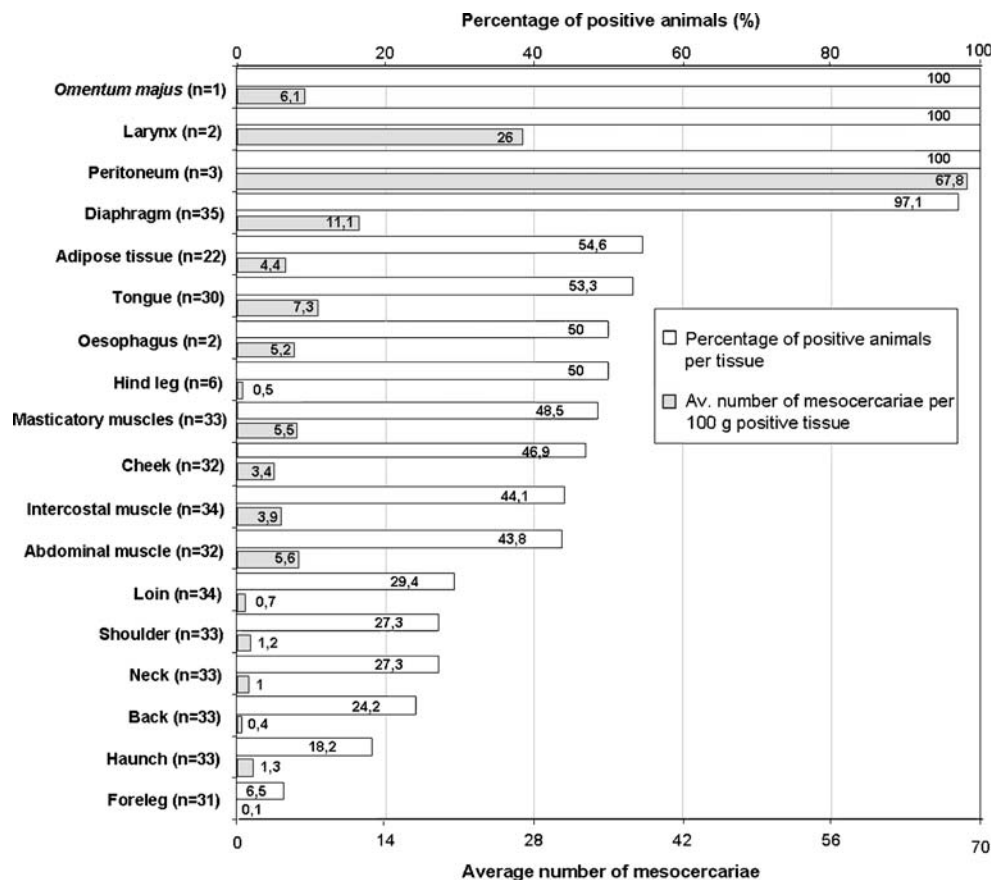


Fig. 2 Average number of *Alaria alata* mesocercariae per 100g tissue (lower x-axis, grey bars) as detected in various sampling sites (n: number of samples) from 35 wild boars and percentage share of animals with a positive result in the tissue/sample (upper x-axis, white bars) as resulting from the *Trichinella* identification method (TIM, 739 samples), lipid digestion method (LDM, 89 samples), and *Alaria* mesocercariae migration technique (AMT, 549 samples)



missing. The wide distribution of DMS within the tissues of wild boars indicates that DMS wanders through the host's body. High amounts of DMS in the peritoneum and retroperitoneal adipose tissue suggest that the larvae wander around the peritoneal cavity before invading different body tissues. A similar path of invasion is known by *Fasciola hepatica* larvae (Jones et al. 1997).

Although basically all tested body tissues were infested by the parasites, our results show in accordance with literature that DMS prefers muscular tissue containing high amounts of adipose and connective tissues and/or glandular tissues. As displayed in Fig. 1, larynx with annexed muscular and connective tissue, pillar of the diaphragm, tongue, masticatory muscles, and "cheek" are frequently infested by DMS and harbored high larval burdens. For *Trichinella* detection by TIM, samples free of all fat and fascia should be taken since these tissues are indigestible and do not contain *Trichinella* larvae (ICT 2007).

The abovementioned differences in *Trichinella* and *A. alata* mesocercariae distribution within the body and the tissues of their hosts show that sampling as stipulated in Annex I, Chapter I, No. 2, and Annex III (a) of the regulation (EC) No. 2075/2005 is only in part applicable for DMS detection. Especially the muscles of the distal foreleg are hardly infested with DMS. Nevertheless, our results

indicate that the diaphragm and the tongue might serve as suitable DMS sampling sites. As the major part of the DMS positive wild boars was preselected in official inspection by these tissues, mainly diaphragm, this indication might be erroneous and our future studies will have to include a true representative sampling of animals.

The special mode of distribution of DMS in the body tissues of the paratenic hosts makes it difficult to determine suitable predilection sites for DMS. The sampling sites as itemized under 2.3 in Table 1 seem to be most appropriate, because they were infested in a high percentage share of animals and harbored high larval burdens. However, if possible, aliquot parts of tissues (5 g) from different sampling sites should be taken and added together for a 30 g specimen in order to account for the heterogeneous distribution of DMS.

First application of the newly developed *A. alata* mesocercariae migration technique proved that the number of DMS retrieved from samples was increased in comparison with pure HCl/pepsin digestion, irrespective of the type of tissue (muscular, adipose, and/or connective tissue) we used. A direct comparison between AMT and TIM demonstrated that the sensitivity of AMT to detect DMS in tissues of wild boars is nearly 60% higher than that of TIM. For these studies, preliminary negative reference samples from veterinary inspection offices were reanalyzed in our

laboratory. The comparison of methods revealed 38 (58.5%) of 65 DMS positive samples that have been judged false negative by application of TIM only. This means that 22 DMS positive wild boars were declared fit for human consumption during official meat inspection.

The low sensitivity of the official reference method for *Trichinella* mainly arises from a higher susceptibility of DMS toward the digestion fluid. This was clearly demonstrated in challenge tests with HCl/pepsin concentrations and digestion times as used in TIM, where the larvae die off or get damaged during digestion. Moreover, a substantial number of mesocercariae might lose their characteristic motility, which is a major diagnostic feature. Furthermore, we have demonstrated that DMS is retained on the sieve as used by TIM.

The AMT works without chemicals. This guarantees a distinctly higher survival rate and motility of the mesocercariae and facilitates diagnosis. Furthermore, the chemical-free implementation minimizes the working and environmental risks and reduces costs. Analytical time requirement is in the range of the TIM or even lower.

Conclusions

Our results demonstrate that the official method for the detection of *Trichinella* spp. in muscle tissue according to Annex I, Chapter I of the regulation (EC) No. 2075/2005 (TIM) is unsuitable for the detection of *A. alata* mesocercariae in meat, in particular as pertaining to sampling and digestion. Using TIM, we have to expect a so far unknown but substantial number of false-negative results. This is not acceptable in view of the potential human pathogenicity of *A. alata* mesocercariae. The newly developed *A. alata* mesocercariae migration technique (AMT) proved to be by far superior to TIM, particularly as pertaining to sensitivity. AMT is a simple, robust, highly applicable, low-cost, and fast method, which we can already recommend—on the basis of a cautiously formulated standard operating procedure—for routine application in official laboratories.

Acknowledgements For their valuable technical assistance in the present study, we would like to thank Lia Kieker, Heiko Wellner, Lutz Gumpert, and DVM Mitja Malunat. Furthermore, we would like to express our gratitude for helpful scientific input made by Dr. Karsten Nöckler, DVM Tanja Wüste, DVM Petra Kabelitz, DVM Frank Lange, Dr. Udo Mann, and Dr. Bernhard Kaufhold. This work was financially supported by the German Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection (BMELV) through the Federal Office for Agriculture and Food (BLE), grant number 2808HS012.

References

- Agerth E (1915) Muskeldistomen beim Wildschwein. Zschr Fleisch Milchhyg 25:289
- Baermann G (1917) Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum- (Nematoden)-Larven in Erdproben. Welteureden. Batavia. Geneesk. Lab. Feestbundel :41–47
- Bagrade G, Kirjusina M, Vismanis K, Ozoliņš J (2009) Helminth parasites of the wolf *Canis lupus* from Latvia. J Helminthol 83 (1):63–68
- BfR (2007) Bundesinstitut für Risikobewertung Wildschweinfleisch kann den gefährlichen Duncker'schen Muskelegel enthalten. Stellungnahme Nr. 027/2007 des BfR vom 1. Juli 2007
- Bridger KE, Whitney H (2009) Gastrointestinal parasites in dogs from the Island of St. Pierre off the south coast of Newfoundland. Vet Parasitol 26;162(1–2):167–170
- Bugge G (1942) Das sogenannte Muskeldistomum, Agamodistomum suis, ein Bewohner der Bauchhöhle des Schweines. Tierärztl Rdsch 48:146–151
- Cort WW, Ackert JE, Augustine DL, Payne FK (1922) Investigations on the control of hookworm disease. II. The description of an apparatus for isolating infective hookworm larvae from soil. Am J Hyg 2:1–16
- Dinaburg AG (1942) The efficiency of the Baermann apparatus in the recovery of *Haemonchus contortus*. J Parasitol 28:433–440
- Duncker HCJ (1881) Distomeen im Schweinefleisch. Zschr mikr Fleischschau 2(3):23–24
- Duncker HCJ (1884) Distomeen im Schweinefleisch. Zschr mikr Fleischschau 3:39–42
- Duncker HCJ (1896) Die Muskel-Distomeen. Berl tierärztl Wschr 24:279–282
- European Commission (2005) Commission Regulation (EC) No. 2075/2005 of 5th December 2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. Official Journal of the European Union L 338/60
- Freeman RS, Stuart PE, Cullen SJ, Ritchie AC, Mildon A, Fernandes BJ, Bonin R (1976) Fatal human infection with mesocercariae of the trematode *Alaria Americana*. Am J Trop Med Hyg 25:803–807
- Große K, Wüste T (2004) Funde des Duncker'schen Muskelegels bei der Trichinenuntersuchung mittels Verdauungsverfahrens. DVG 45. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets "Lebensmittelhygiene" 28.09-01.10.2004 Garmisch Partenkirchen
- Große K, Wüste T (2006) Der Duncker'sche Muskelegel. Funde bei der Trichinenuntersuchung mittels Verdauungsverfahren. Fleischwirtsch 86(4):106–108
- Hall MC (1924) Worm parasites of domesticated animals, parasites of swine. Bureau of Animal Industry, United States Department of Agriculture
- Hemmert-Halswick A, Bugge G (1934) Trichinen und Trichinose. Ergebn. d. allg. Patholol. u. ther. Anatomie d. Menschen u. Tiere:28, 391
- Hiepe TH (1985) Lehrbuch der Parasitologie Bd 3: Veterinärmedizinische Helminthologie. Fischer, Stuttgart, Jena
- International Commission on Trichinellosis (2007) Recommendations on methods for the control of trichinella in domestic and wild animals intended for human consumption. ICT Standards for Control Guidelines Committee. <http://www.med.unipi.it/ict/>
- Jakšić S, Sunčica U, Vučemilo M (2002) Nachweis von Mesozerkarien des Saugwurms *Alaria alata* im Wildschweinfleisch. Z Jagdwiss 48:203–207
- Jones TC, Hunt RD, King NW (1997) Chapter 13: Diseases caused by parasitic helminths and arthropods. In: Veterinary parasitology, 6th edn. Wiley-Blackwell, New York, p 661
- Kapel CM, Webster P, Gamble HR (2005) Muscle distribution of sylvatic and domestic *Trichinella* larvae in production animals and wildlife. Vet Parasitol 132(1–2):101–105
- Marinculic A (2007) TOP 6. Who is the most famous in Croatia Chart 2007, <http://www.iss.it/binary/crlp/cont/MARINCULIC.1214572360.pdf>

- Moehl K, Große K, Hamedy A, Wüste T, Kabelitz P, Lücker E (2009) Biology of *Alaria alata* and human exposition risk to *Alaria mesocercariae*—a review. *Parasitol Res* 105(1):1–15
- Odening K (1960) Der “Dunckersche Muskelegel“ kann experimentell auf den Affen übertragen werden. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 16:395–399
- Odening K (1963) Zur Diagnostik der Mesocercarie von *Alaria alata*, eines möglichen Parasiten des Menschen in Europa, an Hand experimenteller Befunde beim Affen. *Mber Dtsch Akad Wiss Berlin* 5:385–390
- Papazahariadou M, Founta A, Papadopoulos E, Chliounakis S, Antoniadou-Sotiriadou K, Theodorides Y (2007) Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, Northern Greece. *Vet Parasitol* 148(2):170–173
- Pearson JC (1956) Studies of the life cycles and morphology of the larval stages of *Alaria arisaemoides* (Augustine and Uribe, 1927) and *Alaria canis* (LaRue and Fallis, 1936) (Trematoda: Diplostomatidae). *Can J Zool* 34:295–387
- Pillmore RE (1958) Study of lung nematodes of game animals. *Fed. Aid Div. Quart. Rept. Colo. Dept. of Game and Fish*, pp. 1–28
- Pillmore RE (1959) Study of lung nematodes of Bighorn sheep. *Fed. Aid Div. Quart. Rept. Colo. Dept. of Game and Fish*. pp. 73–84
- Popiołek M, Szczesna J, Nowaka S, Mysłajeka RW (2007) Helminth infections in faecal samples of wolves *Canis lupus* L. from the western Beskidy Mountains in southern Poland. *J Helminthol* 81(4):339–344
- Szczesna J, Popiołek M, Schmidt K, Kowalczyk R (2008) Coprological study on helminth fauna in Eurasian lynx (*Lynx lynx*) from the Białowieża Primeval Forest in eastern Poland. *J Parasitol* 94(4):981–984
- Todd KS, Levine ND, Andersen FL (1970) An evaluation of the Baermann technique using infective larvae of *Haemonchus contortus*. *Proc Helminthol Soc Wash* 37:57–63



Detection of *Alaria* spp. mesocercariae in game meat in Germany

UNIVERSITÄT LEIPZIG
600 years: 1409 - 2009

Ernst Lücker, Katharina Möhl, Ahmad Hamedy, Knut Große

¹ Center for Veterinary Public Health, Institute of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Germany
² Stadt Brandenburg an der Havel VLMUV, Klosterstraße 14, 14770 Brandenburg an der Havel, Germany



Introduction

Distomum musculorum suis (DMS) is the mesocercarial stage of the trematode *Alaria alata*, an intestinal parasite of some carnivores (Fig. 1) [3]. Since 1973 several reports about human larval alariosis in North America have been published and recent incidental background findings of *A. alata* mesocercariae in meat of wild boars originating from certain areas of Croatia and Germany [2] initiated a re-assessment of the potential human health risk as posed by this parasite, particularly by the BfR [1,3]. However, a final risk assessment could not be given [1].

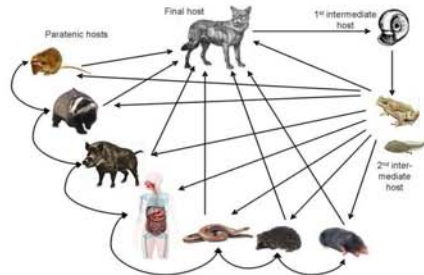


Fig. 1 Life cycle of *Alaria alata* according to literature (Möhl et al. 2009)

Information is needed about both the prevalence of DMS and the suitability of *Trichinella* inspection methods to detect this parasite in wild boar meat (BfR 2007).

Presently, our studies concentrate on the most pressing questions of (i) the optimization and/or development of methods for reliable *Alaria* mesocercariae detection, (ii) the distribution of the mesocercariae within their paratenic hosts, i.e. identification of potential predilection sites, particularly in wild boars, and (iii) their prevalence in sylvatic populations of animals with respect to their introduction into the human food chain. Here, we present first results from the methodological parts of our research project.

Material and Methods

Up to date carcasses of 20 wild boars were acquired from different regions in Germany (Brandenburg). They were identified to be *Alaria* mesocercariae positive during official *Trichinella* inspection (diaphragm, and/or foreleg). The carcasses were dissected and the available muscle tissue totally sampled for detection of *A. alata* mesocercariae.

The muscle material was pooled for digestion (50-100g) according to 11 anatomically defined sampling sites as shown in Table 1.

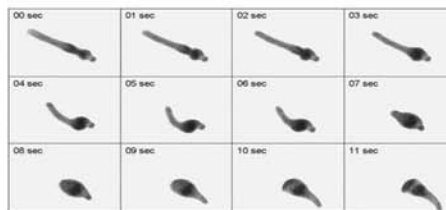


Fig. 2 *Alaria alata* mesocercariae in motion

Examination was performed by use of the official reference method for *Trichinella* detection acc. to EC 2075/2005. The muscle material was pooled for digestion (50-100g) according to 11 anatomically defined sampling sites as shown in Table 1. In addition, samples of fat tissue from the carcasses – so far available – were examined by use of a newly developed method which allows the microscopic detection of *Alaria* spp. mesocercariae after separation from the lipid fraction. Vitality of the mesocercariae was judged on presence/absence of motility (Fig. 2) and, in the latter case, loss of typical structure/shape.

Results

Main findings are:

Substantial heterogeneous distribution of *Alaria* mesocercariae in muscle tissue with preferences to the anterior body parts and false negative results for the conventional *Trichinella* method, even though whole carcasses were digested (Table 1).

Preference to adipose tissue (Table 2) with 2 carcasses remaining unidentified by conventional *Trichinella* digestion (Table 1).

Further, *Alaria* mesocercariae showed a distinctly higher vitality after lipid digestion than after conventional muscle digestion in all cases (data not shown).

Table 1 Number of *Alaria* mesocercariae as retrieved from muscle tissue by conventional *Trichinella* digestion of wild boars' carcasses (n = 20)

	Carcass: #1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	pos/all	
Muscle tissue:																						
Tongue	2	0	*	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	15/19	
M. masseter	6	2	*	0	0	2	48	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	59/19	
Cheek	2	9	0	1	0	12	30	30	0	0	0	0	0	0	0	3	11	2	0	0	120/20	
Neck	2	1	5	0	0	11	1	0	0	0	0	0	3	5	0	0	0	0	0	0	30/20	
Shoulder	1	11	0	1	0	16	0	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	2	0	0	58/20	
Fore leg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20	
Intercostal	1	0	2	0	0	7	6	0	0	0	0	0	0	39	0	0	5	0	0	4	64/20	
Back	1	9	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	16/20	
Abdominal	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3/20	
Pflet	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1/20	
Hind leg	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4/20	
Sum (muscle tissue)	15	32	10	2	0	61	85	30	0	0	0	0	3	75	1	9	17	5	0	6	-	

Table 2 Number of *Alaria* mesocercariae as retrieved from adipose tissue by lipid digestion of wild boars' carcasses (n = 20)

	Carcass: #1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	pos/all
Adipose Tissue	***	***	***	***	***	21	2	6	***	4	0	2	29	5	1	4	***	***	***	0	84/9

Conclusion

Our results strongly indicate that the conventional method as applied for official *Trichinella* examination according to EC/2075/2005 [4] is unsuitable for the detection of *Alaria* mesocercariae in wild boars.

The drawbacks include both sampling sites ("predilection sites") and methodology as pertaining to adipose tissues.

It is recommended to further develop and optimize an alternative method, based on lipid digestion or combined muscle/lipid digestion for epidemiological data acquisition. Only thus, further studies would facilitate a sound assessment of the human exposition risk to *Alaria* mesocercariae in wild game.

References

- [1] BfR (2007) Bundesinstitut für Risikobewertung Wildschweinfleisch kann den gefährlichen Duncker'schen Muskelegel enthalten. Stellungnahme Nr. 027/2007 des BfR vom 1. Juli 2007
- [2] Große K, Wüste T (2006) Der Duncker'sche Muskelegel - Funde bei der Trichinenuntersuchung mittels Verdauungsverfahren. Fleischwirtschaft 4:106-108
- [3] Möhl K, Grosse K, Hamedy A, Wüste T, Kabelitz P, Lücker E. Biology of *Alaria* spp. and human exposition risk to *Alaria* mesocercariae-a review. Parasitol Res. 2009;105(1):1-15
- [4] Verordnung (EG) Nr. 2075/2005 der Kommission vom 5. Dezember 2005 mit spezifischen Vorschriften für die amtlichen Fleischuntersuchungen auf Trichinen

Acknowledgement

The present study was financially supported by the Federal ministry of Food, Agriculture and Consumer protection, Germany.

Correspondence

Dr. K. Möhl
Institut für Lebensmittelhygiene
An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany
+49-341-9738223 (Fax ...38249)
moehl@vmf.uni-leipzig.de



Funde des Duncker'schen Muskelegels im Rahmen der amtlichen Untersuchung auf Trichinellen

T. Wüste¹, K. Große¹, A. Hamedy², K. Möhl², E. Lücker²

¹Stadt Brandenburg an der Havel VLOA, Klosterstraße 14, 14770 Brandenburg an der Havel

²Zentrum Veterinary Public Health, Institut für Lebensmittelhygiene, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Einführung

Im Jahr 2002 wurde im Rahmen der amtlichen Untersuchung auf Trichinellen beim Schwarzwild mittels Digestionsverfahren in einem Schlachtbetrieb im Land Brandenburg erstmals ein Fund des Duncker'schen Muskelegels (DME), der Mesozerkarie des parasitisch lebenden Saugwurms *Alaria alata*, dokumentiert. Weitere Funde in der Stadt Brandenburg folgten und konnten teilweise durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) bestätigt werden. Nach der Veröffentlichung dieser Funde durch die Autoren Große und Wüste⁽¹⁾ in den Jahren 2004 und 2006 kam es im Jahr 2007 zu einer ersten Stellungnahme des BfR⁽¹⁾ bezüglich des Risikos für den Verbraucher und der fleischhygienerechtlichen Beurteilung DME-positiver Stücke. Eine abschließende Bewertung des Risikos konnte aufgrund der mangelhaften Datenlage bezüglich der Prävalenz des Parasiten in den Wildtierbeständen und der Verteilung im Tierkörper nicht vorgenommen werden. Ziel der eigenen Untersuchungen ist die Erhebung von Prävalenzdaten in der gesamten Bundesrepublik Deutschland und im Land Brandenburg.

Materialien und Methoden

Alle Veterinärämter in der gesamten Bundesrepublik Deutschland erhielten zwei Erhebungsbögen mit der Bitte, die Gesamtzahl der Schwarzwilduntersuchungen auf Trichinellen und die Befunde zum Duncker'schen Muskelegel zu dokumentieren und an den Absender zurückzuschicken.

In der Stadt Brandenburg an der Havel wurden mittels Magnetprüfverfahren⁽⁴⁾ gemäß VO (EG) Nr. 2075/2005 neben Schwarzwild auch andere Tiere untersucht.

Erhebungsbogen zu positiven Befunden "Duncker'scher Muskelegel" (DME) während der Untersuchung auf Trichinellen (Stammform)

Bezirk: _____

Ausweis-Nr./Merkmalnummer/Bestandnummer (DME): _____

Untersuchung Schutzzell: _____ 2008

Rück insgesamt	
N. bzw. mit Digestionsverfahren untersucht	Anzahl mit DME-Befund
N. bzw. mit Magnetprüfung untersucht	Anzahl der Mesozerkarien
	Anzahl mit DME-Befund
	Anzahl mit Einzelbefunden

Erhebungsbogen zu positiven Befunden "Duncker'scher Muskelegel" während der Untersuchung auf Trichinellen (DME www.rhghg-jena.uni-leipzig.de)

Bezeichnung: _____

Ausweis-Nr./Merkmalnummer/Bestandnummer: _____

Untersuchungsdatum: _____ Weibchennummer: _____

Wirtstier: Schwein anderes Wild Art bei Wildtier

Geschlecht: weibl. männl. Geschw. 13

Ergebnisse: Fleischprobe Trichinellenprobe

Untersuchungsmethode: Zerschneiden Gremialis Zunge sonstiges

Untersuchungsmethode: Digestion Kapselprobe

Ergebnisse: Einzelbefund ANZ. DME/ANZ. DME/ANZ.

100%ige Prüfung: ja D nein D wenn positiv im Einzelbefund DME/ANZ.

Beurteilung (wichtig zur wissenschaftlichen Bewertung): _____

Bemerkungen / Mitteilungen: _____

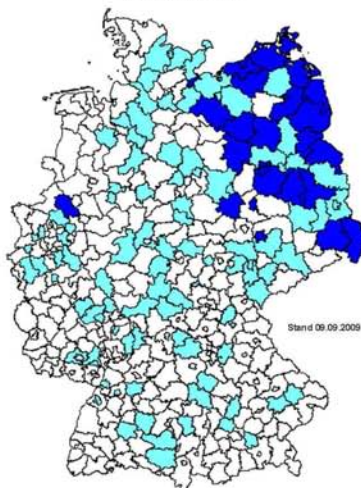
Abb. 2: Erhebungsbogen (Teil 2)

Schlussfolgerungen

- Das Auftreten von DME ist kein alleiniges Problem des Landes Brandenburg. In allen Feuchtgebieten, in denen geeignete Zwischenwirte vorkommen, können sich Wildschweine und andere paratenische Wirte mit DME infizieren.
- Mit dem Wegfall der alternativen Kompressionsmethode und dem flächendeckendem Einsatz der Digestionsmethode zur Diagnostik der Trichinellose beim Schwarzwild nimmt die Häufigkeit der DME-Funde zu.
- Die Identifikation einzelner DME-positiver Tiere aus einer Poolprobe gestaltet sich sehr schwierig. Eine Beanstandung aller Tiere des Sammelansatzes ist jedoch problematisch und gegenüber den Verfügungsberechtigten schwer zu vertreten.

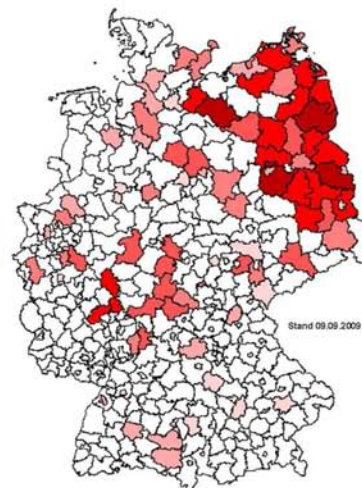
Ergebnisse

- Aus dem gesamten Gebiet der Bundesrepublik wurden Daten und Befunde zum Duncker'schen Muskelegel gesammelt und grafisch in zwei Karten dargestellt.
- Es gingen positive Befunde aus Schleswig-Holstein, Nordrhein-Westfalen, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt, Sachsen und Brandenburg ein (24 Landkreise und kreisfreie Städte).
- Bei den Nachuntersuchungen einzelner Tiere aus Sammelproben konnte nicht immer ein weiterer positiver Befund erhoben werden, das heißt, das Ergebnis konnte nicht in allen Fällen verifiziert werden.



keine Antwort auf Umfrage
Antwort mit DME aus 2002 bis 2009
Antwort ohne DME-Funde

Abb. 3: DME Funde im Bundesgebiet



Keine Antwort / Keine Untersuchungen
Untersuchungen < 500
Untersuchungen < 1.000
Untersuchungen < 2.000
Untersuchungen < 3.000
Untersuchungen < 5.000
Untersuchungen > 5.000

Abb. 4: Schwarzwilduntersuchungen 2008

- Da in der Literatur⁽²⁾ verschiedene paratenische Wirte beschrieben werden, wurden zusätzlich bisher Dachs, Igel, Graureiher, Krähe, Kröten, Bussard, Blindschleiche, Wildente, Wildgans, Fuchs, Kormoran, Schwan, Nutria, Eichhörnchen, Waschbär, Marder, Sperber, Eichelhäher und Marderhund beprobt und die Proben mittels Magnetprüfverfahren gem. VO (EG) Nr. 2075/2005 untersucht.
- Bislang konnten nur bei zwei Dachsen und einem Waschbären Mesozerkarien von *Alaria alata* festgestellt werden.

Literatur

- BfR (2007) Bundesinstitut für Risikobewertung Wildschweinfleisch kann den gefährlichen Duncker'schen Muskelegel enthalten. Stellungnahme Nr. 027/2007 des BfR vom 1. Juli 2007
- Größe K, Wüste T (2006) Der Duncker'sche Muskelegel - Funde bei der Trichinenuntersuchung mittels Verdauungsverfahren. Fleischwirtschaft 4:106-108
- Möhl K, Grosse K, Hamedy A, Wüste T, Kabelitz P, Lücker E. Biology of *Alaria* spp. and human exposition risk to *Alaria mesocercariae*-a review. Parasitol Res. 2009;105(1):1-15
- Verordnung (EG) Nr. 2075/2005 der Kommission vom 5. Dezember 2005 mit spezifischen Vorschriften für die amtlichen Fleischuntersuchungen auf Trichinen

Korrespondenz

DVM Tanja Wüste
Gesundheits- Veterinär- u. Lebensmittelüberwachungsamt
Klosterstraße 14
14770 Brandenburg an der Havel
Tel. 03381-585361 Fax: 03381-585364 E-Mail: tanja.wueste@stadt-brandenburg.de



Studien zur Prävalenz der Mesozerkarie von *Alaria alata* (Duncker'scher Muskelegel) in Wildschweinen in der Uckermark

UNIVERSITÄT LEIPZIG
600 Jahre: 1409 - 2009
V.M.F.
Veterinärmedizinische Fakultät

Petra Kabelitz², Kerstin Franzke², Ahmad Hamedy¹, Katharina Möhl¹, Ernst Lücker¹



¹ Zentrum für Veterinary Public Health, Institut für Lebensmittelhygiene, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, ² Gesundheits- und Veterinäramt Prenzlau, 17291 Prenzlau


Einleitung

Seit der Einführung der zentralen Trichinenuntersuchung mittels Digestionsmethode im Landkreis Uckermark wurden im Zeitraum April 2006 bis April 2009 insgesamt 13.596 Wildschweine untersucht. Dabei wurde mit zunehmender Häufigkeit als Nebenbefund im Sammelansatz die Mesozerkarie von *Alaria alata* nachgewiesen. Die Funde wurden durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) verifiziert.

Die Beurteilung der für die Untersuchung gepoolten Tierkörper gestaltete sich äußerst schwierig. In der Nachuntersuchung konnten nur wenige Wildschweine mit Duncker'schem Muskelegel eindeutig differenziert werden. Eine uneingeschränkte Freigabe der Tierkörper in der Poolprobe war nicht möglich, da ein erster Nachweis vorlag und die Verarbeitung der Wildschweine vorrangig zu Wurst und Schinken vorgesehen war²⁾.

Eindeutige Aussagen zur Tenazität des Erregers, insbesondere gegenüber gängigen Verarbeitungsmethoden (Frosten, Pökeln, Räuchern), können bisher nicht getroffen werden, da entsprechende Ergebnisse nicht vorliegen. Ebenso gibt es bis zum heutigen Tag nur lückenhafte Erkenntnisse zur Relevanz des Erregers für die Gesundheit des Menschen im Zusammenhang mit der Aufnahme über Wildschweinfleisch. Humane Infektionen über unzureichend erhitztes Frosch- und Wildfleisch sind in der Literatur beschrieben^{3) 4)}. Die vorliegende Arbeit präsentiert Teilergebnisse eigener Untersuchungen zur Prävalenz der Mesozerkarie von *Alaria alata* in Wildschweinen in der Uckermark von 2006 bis 2009.



UCKERMARK

Kurzdarstellung des Landkreises Uckermark

- Gesamtfläche: 3.058 km² (damit größter Landkreis Deutschlands)
- Einwohner: ca. 135.000 (Bevölkerungsdichte: ca. 44 Einwohner/km²)
- 58 % (176.549 ha) landwirtschaftliche Nutzfläche¹⁾
- Ca. 50 % der Kreisfläche sind nach dem Naturschutzrecht besonders geschützt
- 3 Großschutzgebiete:
 1. Nationalpark „Unteres Odertal“
 2. Biosphärenreservat „Schorfheide-Chorin“
 3. Naturpark „Uckermärkische Seen“
- 600 Seen größer als ein Hektar und 2800 Kilometer Fließgewässer und Gräben

Aufgrund der landschaftlichen Vielfalt, durch seine Ausstattung und Struktur der Landschaft mit Waldgebieten, ertragreichen Ackerböden, unzugänglichen Mooren mit Schilfgebieten und ausgedehnten Feuchtgebieten ergeben sich hervorragende Bedingungen für einen artenreichen Wildbestand. Rehwild, Rotwild, Damwild, Muffelwild, gelegentlich einwanderndes Elchwild aus Polen und vor allem ein sehr hoher Schwarzwildbestand sind typisch für die Uckermark.

Materialien und Methoden

- Trichinenuntersuchung nach VO (EG) Nr. 2075/2005.
- Elektronische Erfassung der Mesozerkarie von *Alaria alata* als Nebenbefund bei der TU.
- Differenzierung von Einzeliern durch gezielte Nachuntersuchungen mittels Digestionsmethode.
- Gezielte Untersuchungen befallener Tiere/Prädilektionsstellen.
- Auswertung der Teilergebnisse zum Nachweis der Verteilung des Erregers im Tierkörper.

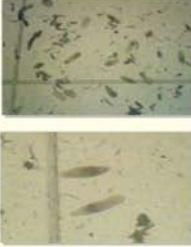

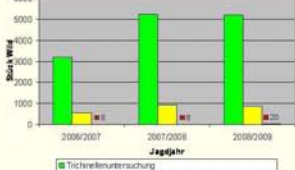




Abb. 1: Verhältniss Trichinenuntersuchung Schwarzwild gesamt, Nachweis Mesozerkarie von *Alaria alata* im Sammelansatz, Nachweis Mesozerkarie von *Alaria alata* am Einzeltier

Ergebnisse

Die bisherigen Teilergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt. Die Mesozerkarienfunde stehen stets in enger Korrelation mit der Gesamtjagdstecke.

- Bei 2.344 Tieren wurde der Erstbefund im Sammelansatz gestellt.
- Differenzierte Einzeltiere (siehe Abb. 1)
 - * in 2006 8 Tiere
 - * in 2007 8 Tiere
 - * in 2008 20 Tiere.
- Die Tiere wiesen ein Gewicht von 12 bis 80 kg auf (Ø 35 kg).
- Das Geschlechterverhältnis war insgesamt ausgewogen.
- Die Verteilung der Befunde erstreckte sich auf den gesamten Landkreis, vorrangig stammen die Tiere aus Feuchtgebieten und großen Schilfgebieten (siehe Abb. 2).
- Bei gezielten Untersuchungen positiver Tierkörper fanden sich die Mesozerkarien bevorzugt im/In der
 - Zungen- und Backenmuskulatur,
 - Zwerchfell,
 - Zwischenrippenmuskulatur,
 - Bauchdecke,
 stets in enger Affinität zum Fettgewebe⁴⁾.

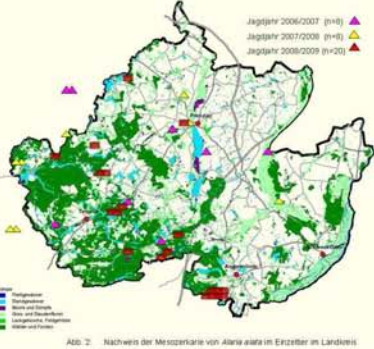


Abb. 2: Nachweis der Mesozerkarie von *Alaria alata* im Einzeltier im Landkreis Uckermark, Zeitraum April 2006 – April 2009

Schlussfolgerungen

- Durch die landschaftliche Vielfalt und dem damit verbundenen hohen Aufkommen an Zwischenwirten (Frosch und Schnecke) ist in der Uckermark mit einer hohen Prävalenz von *A. alata* beim Schwarzwild zu rechnen. Die ersten Untersuchungsergebnisse stützen diese Vermutung.
- Der Nachweis der Parasiten im Wildfleisch gestaltet sich schwierig, da er hauptsächlich als Nebenbefund bei der Trichinenuntersuchung auftritt und ein spezielles Nachweisverfahren fehlt.
- Die Aussagekraft über die tatsächliche Prävalenz ist mit dem Magnetrührverfahren nach VO (EG) Nr. 2075/2005 kaum zu erbringen.
- Untersuchungen zur Tenazität des Erregers bei unterschiedlichen Verarbeitungsmethoden (Frosten, Pökeln, Räuchern) sowie damit verbundenen Erkenntnissen zur Relevanz des Erregers für die Gesundheit des Menschen im Zusammenhang mit der Aufnahme über Wildschweinfleisch sind unbedingt erforderlich.
- Eine Entscheidung über die Verfahrensweise bei Erstbefund und Nachweis der Mesozerkarie von *Alaria alata* in Poolproben, in denen eine Zuordnung zum Einzeltier nicht möglich ist, ist dringend notwendig.

Literatur

- 1) www.uckermark-art.de
Arbeitsärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle
- 2) „Der Duncker'sche Muskelegel“ – Befund und Bewertung, Rüdiger Natzius
- 3) Slavica Jakšić, Sunčica Uršić, Marija Vučković, in: B. Jagbessens 48, (2002) 203 – 207 Blackwell Verlag Berlin
- 4) Sachstandsbericht zum Forschungsvorhaben Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz: „Untersuchung zur Prävalenz des Duncker'schen Muskelegels in der Wildschweinpopulation“
Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät, Institut für Lebensmittelhygiene, An den Tierkliniken 1, Prof. Dr. E. Lücker
- 5) BfR, Stellungnahme Nr. 0272/2007 vom 1. Juli 2007
- 6) BfR, 5004/7/06 Differenzierung des Befundes des Gesundheits- und Veterinäraramtes Prenzlau

Korrespondenz

DVM Petra Kabelitz
Gesundheits- und Veterinäramt Prenzlau
Karl-Marx-Straße 1, D-17291 Prenzlau
+49-3984-701139 Fax: (...701939)
ata@uckermark.de



Untersuchungen zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels in Wildschweinen

UNIVERSITÄT LEIPZIG
600 Jahre: 1409 - 2009

Ahmad Hamedy¹, Katharina Möhl¹, Knut Große², Ernst Lücker¹

¹ Zentrum für Veterinary Public Health, Institut für Lebensmittelhygiene, Leipzig
² Stadt Brandenburg an der Havel VL.MÜV, Klosterstraße 14, 14770 Brandenburg an der Havel



Einleitung

Der Duncker'sche Muskelegel ist ein Entwicklungsstadium von *Alaria alata*, einem Parasiten der Überklasse der Saugwürmer (Trematoda), der im Dünndarm von Fleischfressern als Adultenstadium lebt. Zwischenwirte sind Süßwasserschnecken (*Planorbidae*), in denen sich die so genannten Zerkarien entwickeln. Im zweiten Zwischenwirt, Kaulquappen und Fröschen, entwickeln sich die Mesozerkarien. Neben diesem obligatorischen 2. Zwischenwirt gibt es zahlreiche sogenannte paratenische Wirte, wie Amphibien, Reptilien, Vögel und Säugetiere (Abb. 1).

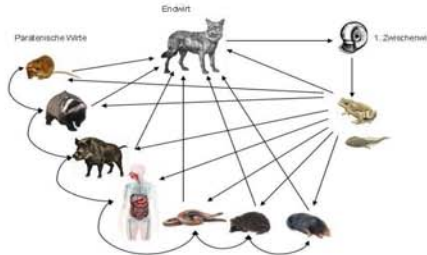


Abb. 1: Lebenszyklus von *Alaria alata* (Möhl et al. 2009)

Bei Menschen hat der Verzehr von unzureichend erhitztem mesozerkarienhaltigem Wildfleisch und Froschschenkeln schwerwiegende Erkrankungen verursacht, zum Teil mit Todesfolge.

Ziel ist es somit, geeignete Prädilektionsstellen für die Untersuchung auf *Alaria alata* festzulegen und gleichzeitig zu überprüfen, in wieweit die zugelassenen Verfahren zur Untersuchung auf *Trichinella* geeignet sind, eine Infektion mit *Alaria alata* sicher nachzuweisen, bzw. eine entsprechende Modifikation dieser Verfahren zu entwickeln.

Material und Methoden

Es wurden bislang mehr als 20 Wildschweine aus verschiedenen Regionen auf das Vorkommen des Duncker'schen Muskelegels (DME) untersucht. Im Rahmen der durchzuführenden Untersuchungen wurden 11 verschiedenen Probenahmestellen pro Tier (Tab. 1) definiert.

Das entnommene Probenmaterial wurde mithilfe des Referenzverfahrens (Magnetrührverfahren, MRV) nach Verordnung (EG) Nr. 2075/2005 für den Nachweis von *Trichinella spiralis* untersucht.

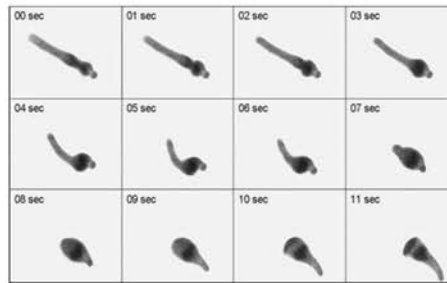


Abb. 2: Die Motilität von *Alaria alata*

Parallel dazu wurden auch Proben, die einen erhöhten Anteil an Fettgewebe aufwiesen, mithilfe eines neuentwickelten modifizierten Magnetrührverfahrens mit Pankreatin® - Verdauung, untersucht.

Es handelt sich hierbei um eine Methodik, welche in Anlehnung an das MRV durchgeführt wird und die es durch die verwendete Enzymmischung (Lipase, Amylase, Protease) ermöglicht, die Parasiten aus dem Fettgewebe zu lösen um sie einer anschließenden lichtmikroskopischen Untersuchung zuführen zu können

Ergebnisse

Die Tabelle 1 zeigt, dass die Mesozerkarien zwar tatsächlich die Lokalisationen der vorderen Körperhälfte favorisieren, welche hohe Anteile an inter- und intramuskulärem Binde- und Fettgewebe aufweisen (Backe, Hals, Schulter, Kaumuskelatur), insgesamt kann die Verteilung jedoch als inhomogen bezeichnet werden.

Mit der Fettverdauungsmethode war es möglich in zwei sonst komplett negativen Wildschweinen vitale *A. alata* Mesozerkarien im Fettgewebe nachzuweisen (Tabelle 2). Bei zwei Tieren (WS14, 16) konnte der Parasit ausschließlich im präparierten Fettgewebe mittels der neu entwickelten Nachweismethode gefunden werden. Weiterhin zeigen die Parasiten in der lichtmikroskopischen Untersuchung bei der Fettverdauung eine deutlich höhere Vitalität als beim konventionellen HCl/Pepsin-Verdau (Abbildung 2).

Tabelle 1: Anzahl von *Alaria*-Mesozerkarien pro Wildschwein und Probenahmestelle mithilfe des Referenzverfahrens für den Nachweis von *Trichinella*

Wildschwein-Nr.:	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	pos/alle	
Probenahmestelle:																						
Zunge	2	0	*	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0	15/19
Kaumuskulatur	6	2	*	0	0	2	48	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	59/19
Backe	2	9	0	1	0	12	30	30	0	0	0	0	0	0	0	3	11	2	0	0	0	120/20
Hals	2	1	5	0	0	11	1	0	0	0	0	0	3	5	0	0	0	0	0	0	2	30/20
Schulter	1	11	0	1	0	16	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	2	0	0	0	0	59/20
Vorderbein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/20
Zwischenrippen	1	0	2	0	0	7	6	0	0	0	0	0	0	39	0	0	5	0	0	0	4	64/20
Rücken	1	9	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	16/20
Bauch	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3/20
Lende	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1/20
Keule	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4/20
Summe	15	32	10	2	0	61	85	30	0	0	0	0	3	75	1	9	17	5	0	6	-	

Tabelle 2: Anzahl der gefundenen *A. alata* Mesozerkarien im Fettgewebe pro Wildschwein

Fettgewebe	***	***	***	***	***	21	2	6	***	4	0	2	29	5	1	4	***	***	***	0	04/9	
Wildschwein-Nr.:	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	pos/alle	

Schlussfolgerung

Die ersten Untersuchungen haben gezeigt, dass das Referenzverfahren nach Verordnung (EG) Nr. 2075/2005 für den Nachweis von *Trichinella spiralis* beim Nachweis von *A. alata* Mesozerkarien erhebliche Mängel aufweist.

DME favorisiert zwar tatsächlich die Lokalisationen der vorderen Körperhälfte, welche hohe Anteile an inter- und intramuskulärem Binde- und Fettgewebe aufweisen (Backe, Hals, Schulter, Kaumuskelatur), insgesamt kann die Verteilung jedoch als inhomogen bezeichnet werden.

Die Weiterentwicklung einer geeigneten, alternativen Nachweismethode scheint neben der Festlegung von geeigneten Prädilektionsstellen somit eine Schlüsselfunktion bei der Beurteilung der Prävalenz des Erregers in den einheimischen Wildtierbeständen und damit verbunden des humanen Expositionsrisikos einzunehmen.

Literatur

- [1] BfR (2007) Bundesinstitut für Risikobewertung Wildschweinfleisch kann den gefährlichen Duncker'schen Muskelegel enthalten. Stellungnahme Nr. 027/2007 des BfR vom 1. Juli 2007
- [2] Große K, Wüste T (2006) Der Duncker'sche Muskelegel - Funde bei der Trichinenuntersuchung mittels Verdauungsverfahren. Fleischwirtschaft 4:106-108
- [3] Möhl K, Grosse K, Hamedy A, Wüste T, Kabelitz P, Lücker E. Biology of *Alaria* spp. and human exposition risk to *Alaria* mesocercariae-a review. Parasitol Res. 2009;105(1):1-15
- [4] Verordnung (EG) Nr. 2075/2005 der Kommission vom 5. Dezember 2005 mit spezifischen Vorschriften für die amtlichen Fleischuntersuchungen auf Trichinen

Projektförderung

Diese Studie wurde durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) finanziell gefördert.

Korrespondenz

Ahmad Hamedy
Institut für Lebensmittelhygiene
An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig, Germany
+49-341-9738226 (Fax ...38249)
hamedy@vetmed.uni-leipzig.de

Einleitung

Der Duncker'sche Muskelegel ist die Mesozoerkarie der Trematode *Alaria alata*, die im Dünndarm von Fleischfressern parasitiert. In der Bundesrepublik Deutschland stellen Marderhunde und Füchse die wichtigsten Endwirte des Parasiten dar. Als Zwischenwirte dienen Süßwasserschnecken der Gattung *Planorbis* in denen sich die Zerkarien entwickeln. Im zweiten Zwischenwirt, Kaulquappen und Fröschen, entwickeln sich die Mesozoerkarien. Neben diesen Zwischenwirten gibt es zahlreiche sogenannte paratenische Wirte wie Amphibien, Reptilien, Vögel und Säugetiere (Abb.1).

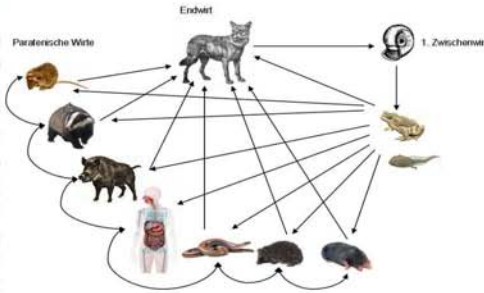


Abb. 1: Lebenszyklus von *Alaria alata* (Möhl et al. 2009)

Bei Menschen hat der Verzehr von unzureichend erhitztem mesozoerkarienhaltigem Wildfleisch und Froschschenkeln mehrfach schwerwiegende Erkrankungen verursacht, zum Teil mit Todesfolge. Weiterhin kann der Parasit bei direktem Kontakt (Schmierinfektion) in das Auge einwandern und hier zu Netzhautschäden führen. Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur unzureichende Informationen bezüglich der Gefährdung von Jagdausübenden und Verbrauchern vorliegen, empfiehlt das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Fleisch, in welchem die Mesozoerkarien nachgewiesen wurden, als untauglich für den menschlichen Verzehr zu beurteilen.

Daten und Fakten

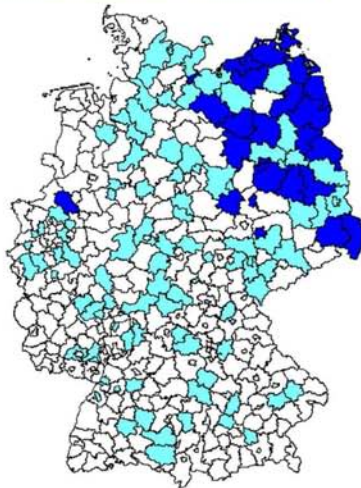


Abb. 2: DME Funde im Bundesgebiet

- Aus dem gesamten Gebiet der Bundesrepublik wurden Daten und Befunde zum Duncker'schen Muskelegel gesammelt und grafisch in zwei Karten dargestellt.
- Es gingen Meldungen über positive Befunde aus Schleswig-Holstein, Nordrhein-Westfalen, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt, Sachsen und Brandenburg ein (24 Landkreise und kreisfreie Städte).
- Die Mesozoerkarienfunde stehen stets in enger Korrelation mit der Gesamtjagdstecke.
- Die befallenen Tiere wiesen ein Gewicht von 12 bis 80 kg auf (Ø 35 kg).
- Das Geschlechterverhältnis war ausgewogen.
- Das Auftreten des Parasiten beim Wildschwein ist eng an das Vorhandensein von Feuchtgebieten, in denen geeignete Zwischenwirte vorkommen, gekoppelt.
- Bei gezielten Untersuchungen positiver Tierkörper fanden sich die Mesozoerkarien bevorzugt im/in der
 - Zungen- und Backenmuskulatur,
 - Zwerchfellspeiler
 - Peritoneum,
 - Abdominalmuskulatur,
 stets in enger Affinität zum Fettgewebe.

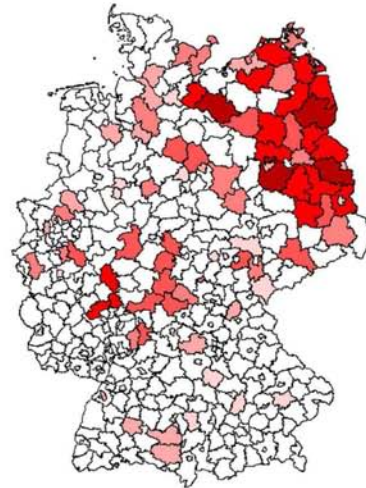


Abb. 3: Schwarzwidderuntersuchungen 2008

Schlussfolgerungen

- Der Verzehr von nicht ausreichend erhitztem Wildfleisch, welches den Duncker'schen Muskelegel enthält, stellt eine potentielle Infektionsquelle für den Menschen dar.
- Eine abschließende Aussage zur Gefährdung des Verbrauchers ist aufgrund fehlender Daten bezüglich der Biologie und der Verteilung des Parasiten in deutschen Wildtierbeständen bislang nicht möglich.
- Beim Umgang mit rohem Wildfleisch sollten besondere Vorsichtsmaßnahmen gelten. Der Befall des Auges durch Schmierinfektion kann zu schwerwiegenden Netzhautschädigungen führen.
- Der Parasit verteilt sich über den gesamten Tierkörper und lässt sich durch eine Kältebehandlung nicht sicher inaktivieren.
- Bei Schwarzwild, welches aus Feucht- bzw. Schilfgebieten stammt, ist von hohen Befallsraten auszugehen.
- Wildbret sollte vor dem Verzehr ausreichend erhitzt werden (Kerntemperatur mind. +70 °C für 10 Minuten oder +80 °C für 5 Minuten).

Kontakt

DVM Tanja Wüste, Stadt Brandenburg a. d. Havel
 Gesundheits-, Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt
 Klosterstr. 14, 14770 Brandenburg a. d. Havel
 tanja.wueste@Stadt-Brandenburg.de

Dr. Katharina Riehn, Institut für Lebensmittelhygiene,
 Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
 An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig
 riehn@vetmed.uni-leipzig.de

Alaria alata – investigations on detection, prevalence and biology of a re-emerging parasite

Katharina Möhl¹, Knut Große², Ahmad Hamedy¹, Tanja Wüste², Petra Kabelitz³, Ernst Lücker¹

¹ Institute of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Food Hygiene, Germany

² Stadt Brandenburg an der Havel VLMÜV, Klosterstraße 14, 14770 Brandenburg an der Havel, Germany

³ Landkreis Uckermark, Gesundheits- und Veterinärämter, Karl-Marx-Straße 1, 17291 Prenzlau, Germany

Distomum musculorum suis (DMS) is the mesocercarial stage of the trematode *Alaria alata*, an intestinal parasite of some carnivores. The regular life cycle of the parasite can be extended by a number of paratenic hosts. Recent incidental background findings of *A. alata* mesocercariae in meat of wild boars initiated a re-assessment of the potential human health risk as posed by this parasite.

Since 1973 several reports about human larval alariosis in North America have been published. The parasite infestation in humans manifests itself in various clinical signs which range from low-grade symptoms and a diffuse unilateral subacute neuroretinitis to an anaphylactic shock with lethal consequence. Nearly all cases of human alariosis could be linked with consumption or handling of game meat and/or frog legs.

The risk for humans was generally ignored or at least postulated to be negligible until this issue re-emerged in Europe: Jakšić et al. (2002) and Große & Wüste (2004, 2006) published results on repeated incidental findings of DMS in meat of wild boars during *Trichinella* inspection in certain areas of Croatia and Germany respectively.

The Federal Institute of Risk Assessment concluded that meat which contains *A. alata* mesocercariae should be regarded as unfit for human consumption. A risk assessment could not be given due to the lack of information about both the prevalence of DMS and the suitability of *Trichinella* inspection methods to detect this parasite in wild boar meat. Against the backdrop of a general lack of knowledge in relevant areas of *Alaria* biology the own studies concentrate on the most pressing questions of the optimization and/or development of methods for reliable *Alaria* mesocercariae detection, the distribution of the mesocercariae within their paratenic hosts, i.e. identification of potential predilection sites, particularly in wild boars, and their prevalence in sylvatic populations of animals with respect to their introduction into the food chain.

Alaria alata – a re-emerging parasite?

Katharina Möhl, Ahmad Hamedy, Ernst Lücker

Institute of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Food Hygiene, Germany

Alaria alata is an intestinal parasite of some carnivores. *Alaria* spp. develop in a three-host life cycle with an interjectional mesocercarial stage between cercarial and metacercarial stage. This regular life cycle can be extended by a number of paratenic hosts. Recent findings of *A. alata* mesocercariae in wild boars in Europe initiated a re-assessment of the potential human health risk as posed by this parasite.

Experimental infections of primates in mid-20th century demonstrated that *Alaria* mesocercariae can cause severe damages within paratenic hosts closely related to humans and since 1973 several reports about human larval alariosis, particularly with lethal consequence, have been published in North America. Nearly all cases could be linked with consumption or handling of game meat and frog legs.

Jakšić et al. (2002) and Große & Wüste (2004, 2006) published results on repeated incidental findings of DMS in meat of wild boars during *Trichinella* inspection in certain areas of Croatia and Germany respectively.

The Federal Institute of Risk Assessment concluded that meat which contains *A. alata* mesocercariae should be regarded as unfit for human consumption. A risk assessment could not be given yet, mainly because of a lack of information about essentials in both, detection and prevalence of the parasite. The development of a reliable method for detection of the mesocercariae in meat seems to be one of the key factors for understanding the parasites biology. Simultaneously the distribution patterns of the mesocercariae within their paratenic hosts need to be investigated thoroughly with the view to determine potential predilection sites in wild boars. Finally the parasites' prevalence in sylvatic populations of animals needs to be elucidated. This work is financially supported by the German Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection through the Federal Institute for Agriculture and Nutrition, grant number 2808HS012.

Lebensmittelassoziierte parasitäre Zoonosen – alte Probleme und neue Herausforderungen

Katharina Möhl, Karsten Fehlhaber, Martina Ludewig, Ernst Lücker

Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig

Lebensmittelassoziierte Parasiten können einerseits die Gesundheit des Verbrauchers gefährden oder schädigen, zum anderen können sie Veränderungen und Qualitätsmängel verursachen, die dazu führen, dass das Lebensmittel, auch ohne das Vorliegen einer konkreten Gesundheitsgefährdung, nicht mehr geeignet zum menschlichen Verzehr ist. In einigen Fällen reicht bereits die bloße Präsenz des Parasiten, um die Qualität eines Lebensmittels zu mindern oder ihm seine Verkehrs- und Verzehrbarkeit abzuspochen. Dass es hier auch Grenzfälle gibt, zeigen die Beispiele des „Croatian rotten cheese“ und des „Casu marzu“ welchen der gewünschte Befall durch die Käsefliege (*Piophilidae casei*, „Cheese skipper“) eine besondere Textur verleiht. *Piophilidae casei* ist üblicherweise als Lästling in der Lebensmittelproduktion bekannt. Die Weibchen legen ihre zylindrisch-ovalen Eier an konservierten Lebensmitteln (Fisch, Schinken, Käse) ab, von denen sich die Larven ernähren. Die orale Aufnahme des Parasiten kann darüber hinaus zu einer Myiasis führen (Scott 1964, Saleh & el Sibae 1993).

Wasser und Nahrungsmittel stellen für viele Protozoen und Helminthen einen wichtigen Übertragungsweg dar und die Assoziation zwischen dem Verzehr von Nahrungsmitteln tierischer Herkunft und dem Auftreten bestimmter Parasitosen des Menschen ist schon lange bekannt. Nachdem Owen und Paget 1835 das Auftreten von *Trichinella* Larven im Diaphragma des Menschen beschrieben, wurde 1859/60 der komplette Lebenszyklus von *Trichinella spiralis* sowie der Zusammenhang zwischen trichinösem Fleisch und Erkrankungen des Menschen von Virchow, Leukart und Zenker demonstriert. Seit dieser Zeit ist der Parasit als Verursacher schwerer humaner Erkrankungen bekannt und schon 1863 wurden in Deutschland erste Vorschriften zur Untersuchung von Fleisch auf Trichinellen erlassen. Das heutige Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Prinzip konnte so im Grundsatz erstmals realisiert werden. Indes reicht die Geschichte der Erkrankung viel weiter zurück, was durch Larvenfunde in ägyptischen Mumien gezeigt werden konnte.

Trotz der langen und genauen Kenntnis lebensmittelassoziiert parasitärer Zoonosen nimmt die Lebensmittelparasitologie eher eine Außenseiterposition innerhalb der Lebensmittelhygiene ein und nur wenige Nachweisverfahren sind bis heute Standardisierungs- und Validierungsverfahren, vergleichbar denen der Mikrobiologie, unterzogen worden. Gründe hierfür sind vor allem in den komplizierten Vermehrungszyklen vieler Parasiten und den Schwierigkeiten bei der Herstellung von Standardmaterialien zu suchen. So wird die Lebensmittelparasitologie weniger als eigenständige wissenschaftliche

Disziplin angesehen, sondern eher als eine „Subdisziplin“, eingeordnet zwischen Mikrobiologie und Zoologie. Weiterhin wird der Formenkreis der parasitär bedingten Erkrankungen des Menschen oftmals in den Kontext der Tropenmedizin gestellt, was dazu führt, dass die Symptome dieser Parasitosen von Ärzten entweder gar nicht erkannt oder einer bakteriell bzw. viral bedingten Erkrankung zugeschrieben werden, da diese gegenüber den parasitären Erkrankungen im Hinblick auf die Volksgesundheit eine wesentlich höhere Bedeutung haben. Das führt in der Konsequenz zu einer, z.T. wohl erheblichen, Unterschätzung der tatsächlichen Erkrankungsfälle. Gerade die beschriebenen Probleme sollten zu einer erhöhten Aufmerksamkeit gegenüber parasitären Zoonosen in der Produktion tierischer Lebensmittel führen, tatsächlich jedoch rücken diese Erkrankungen in den Industrienationen heute immer mehr aus dem Fokus des Interesses der Gesundheits- und Lebensmittelbehörden. Dies geschieht vor allem mit dem Hinweis auf die hohen Hygiene- und Produktionsstandards in der Lebensmittelindustrie, die umfassende gesundheitliche Aufklärung der Konsumenten und die damit verbundenen sinkenden Infektionsraten bei einigen dieser Erkrankungen. Betrachtet man auf der anderen Seite die immer weiter zunehmende Globalisierung in der Lebensmittelproduktion, den expandierenden internationalen Reiseverkehr, die verstärkte Migration in die Industrienationen und damit auch verbunden die Etablierung neuer Verzehrsgewohnheiten, sowie den demographischen Wandel in der Bevölkerung, so ergeben sich unter Umständen neue Risiken in Bezug auf diese lebensmittellassozierten Parasitosen. In die Betrachtung dieser Risiken muss vor allem die Vielzahl der Wege einbezogen werden, über die Parasiten in Lebensmittel gelangen können. So können lebensmittelliefernde Tiere zum einen als Zwischenwirt für Parasiten dienen, zum anderen kann eine sekundäre Kontamination auch über infiziertes Personal, verunreinigtes Wasser und andere belebte und unbelebte Vektoren erfolgen. Gerade Lebensmittel, welche traditionell roh verzehrt werden oder nur einer Behandlung unterzogen werden, welche gerade die einzystierten Parasiten nicht abzutöten vermag, dürfen in diesem Zusammenhang als besonders sensibel gelten. Weiterhin gibt es in den Industrienationen immer mehr ältere Menschen und immunsupprimierte Personen, bei denen ein erhöhtes Risiko besteht, an lebensmittellassozierten Parasitosen zu erkranken.

Untersuchungen zum Nachweis und zur Prävalenz des Duncker'schen Muskelegels in Wildtierpopulationen - erste Ergebnisse

K. Möhl¹, K. Große², A. Hamedy¹, T. Wüste², P. Kabelitz³, E. Lücker¹

1) Universität Leipzig, Institut für Lebensmittelhygiene

2) Stadt Brandenburg an der Havel Gesundheits-, Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt, Klosterstraße 14, 14770 Brandenburg an der Havel

3) Landkreis Uckermark, Gesundheits- und Veterinäramt, Karl-Marx-Straße 1, 17291 Prenzlau

Die im Rahmen der amtlichen Untersuchung auf *Trichinella* seit dem Jahre 2004 in Brandenburg regelmäßig auftretenden Funde von *Alaria alata* Mesocercarien in Wildschweinfleisch machen eine Bewertung des potentiellen Gesundheitsrisikos für den Verbraucher im Zusammenhang mit diesem Parasiten notwendig. Dass dieses Risiko noch vor Kurzem als vernachlässigbar galt und bis zum heutigen Tag keine entsprechende Risikoanalyse erstellt werden konnte, liegt zum einen an den lückenhaften Informationen bezüglich der Biologie und Prävalenz des Parasiten. Zum anderen fehlte bisher eine geeignete Nachweismethode zur sicheren Detektion der Mesocercarien in den verschiedenen Wirtsgeweben. Somit konzentrieren sich die eigenen Studien auf (a) die Optimierung und/oder die Entwicklung einer zuverlässigen Nachweismethode für *A. alata* Mesocercarien, (b) die Untersuchung der Verteilung der Mesocercarien im Wirtsgewebe und damit verbunden die Bestimmung potentieller Prädilektionsstellen, v.a. im Wildschwein, und (c) die Prävalenz des Parasiten in verschiedenen Wildtieren mit besonderer Berücksichtigung ihrer Bedeutung innerhalb der menschlichen Nahrungskette. Weiterhin sollen die Tenazität der Mesocercarien in verschiedenen Wirtsgeweben gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen untersucht und anhand der ermittelten phänotypischen Unterschiede auch eventuelle genotypische Varianzen ermittelt werden. Erste eigene Untersuchungsergebnisse bezüglich der Verteilung des Parasiten im Tierkörper deuten darauf hin, dass die bisher empfohlene Untersuchungsmethode (Magnetrührverfahren nach VO (EG) Nr. 2075/2005) nicht geeignet für den Nachweis der Mesocercarien im Wirtsgewebe ist.

Solange die offenen Fragen zu Biologie, Prävalenz und Tenazität des Erregers nicht abschließend geklärt sind und eine entsprechende Risikobewertung nicht vorgenommen werden kann, ist diese lebensmittelassoziierte parasitäre Zoonose als pathogen für den Menschen zu betrachten.

Das Projekt (Projektnummer 2808HS012) wird mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz und des Bundesinstituts für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) gefördert.

Untersuchungen zum Nachweis und zur Prävalenz des Duncker'schen Muskelegels in Wildtierpopulationen - Erste Ergebnisse

Katharina Möhl, Ahmad Hamedy, Ernst Lücker

Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig

Der Duncker'sche Muskelegel (*Distomum musculorum suis*, Duncker, 1896, syn. *Agamodistomum suis*, Stiles, 1898) ist die Mesozerkarie der adulten Trematode *Alaria alata* (Goeze 1782), welche im Darm von verschiedenen Carnivoren (Hund, Katze, Fuchs, Wolf, Nerz u.a.) parasitiert. Der Lebenszyklus der *Alaria*-Spezies konnte erst Mitte des 20. Jahrhunderts vollständig aufgeklärt werden. Auch die Rolle des Duncker'schen Muskelegels im Zusammenhang mit dem Zyklus von *Alaria alata* wurde erst zu diesem Zeitpunkt erkannt (Dollfus & Chabaud 1953, Stefanski & Tarczyński 1953). Während bei der Gattung *Strigea* ein obligatorischer (echter) 4-Wirte Zyklus vorliegt, handelt es sich beim Zyklus von *Alaria* um einen 3-Wirte-Zyklus mit einem eingeschobenen Mesozerkarial-Stadium zwischen dem Zerkarial- und dem Metazerkarial-Stadium der durch Einschaltung paratenischer Wirte (= Reservewirte) erheblich erweitert werden kann (Abb. 1).

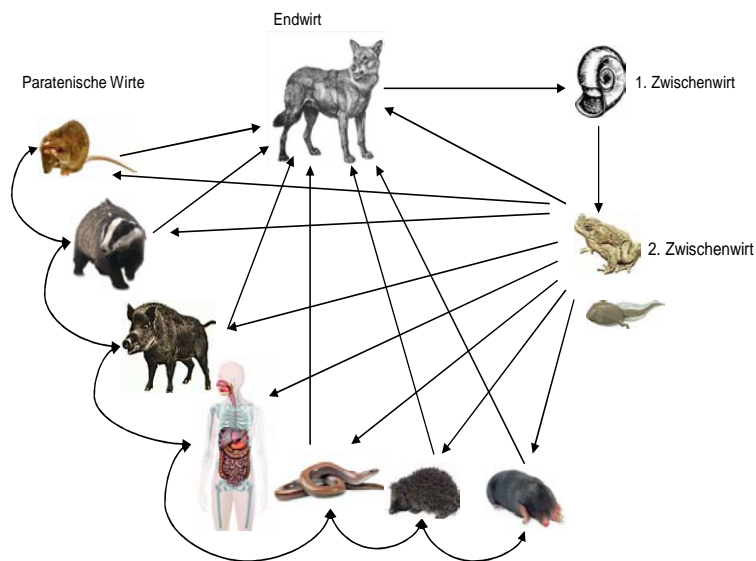


Abb. 1:
Entwicklungszyklus
von *Alaria alata*

Als Krankheitserreger haben die Metazerkarien und Adulten dieser Trematodengattung eine eher untergeordnete Bedeutung. Odening wies jedoch bereits 1961 auf die potentielle Schädigung der Mesozerkarien in paratenischen Wirten hin. Die beobachteten Läsionen sind vor allem durch die in diesen „Sammelwirten“ auftretenden hohen Befallsdichten, nach wiederholter Aufnahme der Mesozerkarien zu erklären. Ljubaschenko & Petrov (1962) berichten über Schäden, die der Parasit bei den Endwirten (Füchse, Hunde und Polarfüchse) verursacht. Die Autoren unterscheiden dabei zwischen zwei verschiedenen Krankheitsbildern: die metazerkariale Alariose, die sich in einer Schädigung der Lunge, der

Pleura und der bronchialen Lymphgefäßen manifestiert und einer durch adulte Parasiten hervorgerufenen Enteritis, welche zu generalisierten Intoxikationssymptomen führen kann (Ljubaschenko & Petrov 1962). Danijarow (1968) berichtet über hohe ökonomische Verluste in Pelztierfarmen, hervorgerufen durch den Befall der Tiere mit *A. alata*. Weiterhin wurden seit der experimentellen Infektion eines Primaten durch Odening (1961) diverse Infektionen beim Menschen diagnostiziert, die in ihrer Schwere und Symptomatik stark differierten (s. Tabelle 2).

Hauptinfektionsquellen sind der Verzehr von unzureichend erhitztem, parasitenhaltigem Wildfleisch (paratenische Wirte) oder Froschschenkeln (2. Zwischenwirt). Es ist zu beachten, dass die Übertragung der Mesozerkarien von einem auf den anderen paratenischen Wirt, also auch auf den Menschen, ohne Einbußen der Infektiosität möglich ist (Pearson 1958, Odening 1963, Rommel 2000). Bisher liegen keine Berichte über in Deutschland aufgetretene Fälle einer larvalen Alariose vor, allerdings kann infolge des geringen Bekanntheitsgrades dieser Zoonose eine relevante Dunkelziffer nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 1: Fälle von larvaler Alariose beim Menschen

Jahr	Parasit	Ort	N	Manifestation	Infektionsweg und Vektor	Autor
1969	<i>Alaria</i> (?) Mesozerkarien	CA, USA	1	Auge	(?), (?)	Byers & Kimura, 1974, McDonald et al. 1994
1972	<i>Alaria</i> Mesozerkarien	Ontario, Kanada	1	Auge	Schmier-Infektion bei der Zubereitung von Froschschenkeln	Shea et al. 1973
1975	<i>Alaria americana</i> Mesozerkarien	Ontario, Kanada	1	Generalisiert (mit Todesfolge)	A (Froschschenkel)	Fernandes et al. 1976; Freeman et al. 1976
1975	<i>Alaria</i> Mesozerkarien	LA, USA	1	Haut	A (Wild, Waschbärfleisch (?))	Beaver et al. 1977
1988	<i>Alaria</i> Mesozerkarien	CA, USA	1	Auge	A (Wild) oder Froschschenkel (MSI)	McDonald et al. 1994
1990	<i>Alaria americana</i> Mesozerkarien	CA, USA	1	Auge	A (Wild) oder Froschschenkel (MSI)	McDonald et al. 1994
1993	<i>Alaria americana</i> Mesozerkarien	Kanada	1	Resp. Trakt, Auge	A (Wildgans (?))	Kramer et al. 1996

N: Fälle; (?): nicht bestätigt, unbekannt; MSI: Mögliche Schmier-Infektion; A: alimentär

Wie bei den meisten Trematodeninfektionen geht die Infektion mit *A. alata* mit einer Eosinophilie und einer IgE-Erhöhung einher (Löscher & v. Sonnenburg 2005). Somit ist bei einer entsprechenden Sensibilisierung und der wiederholten Aufnahme von parasitenhaltigem Material die Ausbildung einer generalisierten allergischen Reaktion möglich, deren Symptome je nach Schweregrad zum anaphylaktischen Schock mit vasomotorischem Kollaps, Blutdruckabfall, Tachykardie und Bewusstlosigkeit führen können (Bork 1985, Egger 2005). Weiterhin kann es durch Schmierinfektion zur Ausbildung einer unilateralen subakuten Neuroretinopathie als spezielle Form der humanen Alariose kommen. Die Erkrankung wird zum Formenkreis Ocular larva migrans (OLM) oder „trematode endophtalmitis“ gezählt. Hierbei kommt es nach Einwanderung der Mesozerkarien ins Auge zu einer Entzündung und Schädigung der Retina, welche durch toxische Stoffe der Parasiten (Stoffwechselprodukte, Proteasen) und eosinophile Leukozyten ausgelöst wird. Ausdruck dieser Schädigung sind die sog. chorioretinalen Straßen („tracks“). Man findet die Parasiten, welche bis zu drei Jahren im Auge überleben können, sowohl prä-, intra- als auch subretinal (Bialasiewicz 2000). Trotz dieser, z. T. schweren, Erkrankungsfälle beim Menschen wurde dieser lebensmittelassoziierten parasitären Zoonosen in Westeuropa lange Zeit keine oder nur wenig Bedeutung beigemessen.

Alaria spp. ist weltweit verbreitet (Mehlhorn 2008). Mehlhorn geht im Falle von *Alaria alata* von einer Erreger-Prävalenz von etwa 30 % in verschiedenen Wildcaniden aus, was durch die der Tabelle 2 zu entnehmenden Untersuchungsergebnisse anderer Autoren gestützt wird.

Auch die Anzahl der gefundenen Erreger variiert stark und reicht von einem bis zu 1.533 adulten Helminthen pro Tier (Shimalov u. Shimalov 2000a, 2001a, 2001b, 2001c, 2002, 2003, Moks et al. 2006). Obwohl alleine die Endwirte des Parasiten dessen infektiöse Eier ausscheiden, kann es nach Aussage verschiedener Autoren durchaus zu einer Infektion zwischen paratenischen Wirten kommen (Odening 1963). So ist besonders bei Allesfressern wie Wildschweinen, die in Gebieten mit einem hohen Durchseuchungsgrad der Endwirte leben, sowohl mit einer hohen Erreger-Prävalenz als auch mit hohen Befallsraten zu rechnen, da diese Tiere neben den eigentlichen 2. Zwischenwirten auch infizierte Kleinnager, Reptilien und Amphibien aufnehmen und es zu einer Anreicherung der Parasiten in der Muskulatur der Tiere kommt (Dönges 1969). Über die Möglichkeit einer vertikalen Übertragung der Mesozerkarien wurde ebenfalls schon von verschiedenen Autoren berichtet (Shoop und Corkum 1983, 1984a, 1984b, 1987, Pence et al. 1988, Shoop et al. 1990). Grundsätzlich muss mit einem bedeutsamen Vorkommen von *A. alata* Mesozerkarien in Wildtierpopulationen in wasserreichen Gebieten und bei Vorhandensein der verschiedenen Wirtspezies (Schnecken, Froschlurche, Endwirte) gerechnet werden.

Tabelle 2: Alaria alata Infektionen am Beispiel von Wildcaniden

Wirt	Gebiet	Prävalenz (%)	Autor
<i>Pseudalopex gymnocercus</i> (Pampas Fuchs)	Brasilien	36,4	Ruas et al. (2008)
<i>Cerdocyon thous</i> (Maikong)	Brasilien	50,0	Ruas et al. (2008)
<i>Canis lupus L.</i> (Europ. Wolf)	Estland	89	Moks et al. (2006)
<i>Canis lupus L.</i> (Europ. Wolf)	Belarus	17,3	Shimalov u. Shimalov (2000)
<i>Vulpes vulpes L.</i> (Rotfuchs)	Dänemark	15,4	Saeed et al. (2006)
<i>Vulpes vulpes L.</i> (Rotfuchs)	Schweden	40,6	Persson et al. (1971)
<i>Vulpes vulpes L.</i> (Rotfuchs)	Deutschland	29,7	Lucius et al. 1988
<i>Vulpes vulpes L.</i> (Rotfuchs)	West Berlin	28,3	Saar (1957)
<i>Vulpes vulpes L.</i> (Rotfuchs)	Polen	88,0	Kozłowska (1957)
<i>Vulpes vulpes L.</i> (Rotfuchs)	Polen	76,5	Furmaga et al. (1951)
<i>Vulpes vulpes L.</i> (Rotfuchs)	Jugoslawien	64,5	Lozanić (1966)
<i>Vulpes vulpes L.</i> (Rotfuchs)	Belarus	42,6	Shimalov u. Shimalov (2003)
<i>Vulpes vulpes L.</i> (Rotfuchs)	Portugal	27,4	Eira et al. (2006)

Seit dem Jahr 2002 kam es in Brandenburg bei der Trichinellenuntersuchung von Schwarzwild regelmäßig zu Nachweisen des Duncker'schen Muskelegels (Große & Wüste 2004, Große & Wüste 2006), welche durch das Bundesamt für Risikobewertung (BfR) bestätigt wurden. In gleichen Jahr wiesen Jakšić et al. *Alaria alata* in 1,8 % von 210 untersuchten Wildschweinfleisch-Proben aus der Republik Kroatien nach (Jakšić et al. 2002). In seiner Stellungnahme Nr. 027/2007 vom 1. Juli 2007 spricht sich das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), mit Hinweis auf das zoonotische Potential des Erregers, dafür aus, dass Fleisch in welchem die Mesozerkarie des Saugwurms *Alaria alata* nachgewiesen wurde, aus Gründen des gesundheitlichen Verbraucherschutzes als untauglich für den menschlichen Verzehr zu beurteilen ist. Eine abschließende Beurteilung einer gesundheitlichen Gefährdung der Verbraucher ist jedoch infolge mangelnder Kenntnisse über die Verteilung des Parasiten im Tierkörper und damit verbunden die Beurteilung der Eignung der zur Verfügung stehenden Nachweismethode nicht möglich. Gleichzeitig fehlen Untersuchungen über die Häufigkeit des Vorkommens des Parasiten in deutschen Wildtierbeständen (Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) 2007, Möhl et al. 2009).

Im Rahmen eines am Institut für Lebensmittelhygiene durchgeführten und mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz und des Bundesinstituts für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) geförderten Forschungsvorhabens sollen in diesem Zusammenhang geeignete Prädilektionsstellen für die Untersuchung auf *Alaria alata* festgelegt und gleichzeitig überprüft werden, in wieweit die zugelassenen Verfahren zur Untersuchung auf *Trichinella* (Magnetrührverfahren nach VO (EG) Nr.

2075/2005) geeignet sind, eine Infektion mit *Alaria alata* sicher nachzuweisen, bzw. eine entsprechende Modifikation dieser Verfahren zu entwickeln. Des Weiteren wird zur Klärung der Prävalenz des Erregers eine deutschlandweite Status-Quo-Erhebung in der Wildtierpopulation, insbesondere der Wildschweinpopulation, durchgeführt. Die Datenerhebung wird insbesondere in Regionen vorgenommen, in denen bereits erste DME-Befunde bei der Trichinellenuntersuchung aufgetreten sind. Weiterhin sollen die Tenazität der Mesozerkarien in verschiedenen Wirtsgeweben gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen untersucht und anhand der ermittelten phänotypischen Unterschiede auch eventuelle genotypische Varianzen ermittelt werden. Erste eigene Untersuchungsergebnisse bezüglich der Verteilung des Parasiten im Tierkörper deuten darauf hin, dass die bisher empfohlene Untersuchungsmethode (Magnetrührverfahren nach VO (EG) Nr. 2075/2005) nicht geeignet für den Nachweis der Mesozerkarien im Wirtsgewebe ist (Möhl et al. 2009).

Untersuchungen zum Nachweis und zur Prävalenz des Duncker'schen Muskelegels in Wildschweinen - ein Update

Katharina Riehn¹, Ahmad Hamedy¹, Knut Große², Petra Kabelitz³, Tanja Wüste², Lina Zeitler¹, Ernst Lücker¹

1 Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig

2 Stadt Brandenburg an der Havel Gesundheits-, Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt

3 Landkreis Uckermark, Gesundheits- und Veterinäramt

Der Duncker'sche Muskelegel (*Distomum musculorum suis*, Duncker, 1896, syn. *Agamodistomum suis*, Stiles, 1898) ist die Mesozerkarie der adulten Trematode *Alaria alata* (Goeze 1782), welche im Darm von verschiedenen Carnivoren (Hund, Katze, Fuchs, Wolf, Nerz u.a.) parasitiert. *Alaria* spp. ist weltweit verbreitet und es sind seit Beginn der 70er Jahre verschiedene Fälle humaner Alariose dokumentiert, die in ihrer Manifestation und Schwere stark variierten und in einem Fall sogar zum Tode geführt haben.

Seit dem Jahr 2002 kam es in Brandenburg bei der Trichinellenuntersuchung von Schwarzwild regelmäßig zu Nachweisen des Duncker'schen Muskelegels (Große & Wüste 2004, Große & Wüste 2006), welche durch das Bundesamt für Risikobewertung (BfR) bestätigt wurden. In gleichen Jahr wiesen Jakšić et al. *Alaria alata* in 1,8 % von 210 untersuchten Wildschweinfleisch-Proben aus der Republik Kroatien nach (Jakšić et al. 2002). In seiner Stellungnahme Nr. 027/2007 vom 1. Juli 2007 spricht sich das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), mit Hinweis auf das zoonotische Potential des Erregers, dafür aus, dass Fleisch in welchem die Mesozerkarie des Saugwurms *Alaria alata* nachgewiesen wurde, aus Gründen des gesundheitlichen Verbraucherschutzes als untauglich für den menschlichen Verzehr zu beurteilen ist. Eine abschließende Beurteilung einer gesundheitlichen Gefährdung der Verbraucher ist jedoch infolge mangelnder Kenntnisse über die Verteilung des Parasiten im Tierkörper und damit verbunden die Beurteilung der Eignung der zur Verfügung stehenden Nachweismethode nicht möglich. Gleichzeitig fehlen Untersuchungen über die Häufigkeit des Vorkommens des Parasiten in deutschen Wildtierbeständen (Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) 2007, Möhl et al. 2009).

Im Rahmen eines am Institut für Lebensmittelhygiene durchgeführten und mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz und des Bundesinstituts für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) geförderten Forschungsvorhabens sollen in diesem Zusammenhang geeignete Prädilektionsstellen für die Untersuchung auf *Alaria alata* festgelegt und gleichzeitig überprüft werden, in wieweit die zugelassenen Verfahren zur Untersuchung auf *Trichinella* (Magnetrührverfahren nach VO (EG) Nr. 2075/2005) geeignet sind, eine Infektion mit *Alaria alata* sicher nachzuweisen, bzw. eine entsprechende Modifikation dieser Verfahren zu entwickeln. Des Weiteren wird zur Klärung der Prävalenz des Erregers eine deutschlandweite Status-Quo-Erhebung in der

Wildtierpopulation, insbesondere der Wildschweinpopulation, durchgeführt. Die Datenerhebung wird vor allem in Regionen vorgenommen, in denen bereits erste DME-Befunde bei der Trichinellenuntersuchung aufgetreten sind. Zusätzlich sollen die Tenazität der Mesozerkarien in verschiedenen Wirtsgeweben gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen untersucht und anhand der ermittelten phänotypischen Unterschiede auch eventuelle genotypische Varianzen ermittelt werden. Erste eigene Untersuchungsergebnisse bezüglich der Verteilung des Parasiten im Tierkörper deuten darauf hin, dass die bisher empfohlene Untersuchungsmethode (Magnetrührverfahren nach VO (EG) Nr. 2075/2005) nicht geeignet für den Nachweis der Mesozerkarien im Wirtsgewebe ist (Möhl et al. 2009), was die Entwicklung einer besser geeigneten Nachweismethode erforderlich gemacht hat.

**Länderarbeitsgemeinschaft Verbraucherschutz
Arbeitsgruppe Fleisch- und Geflügelfleischhygiene und
fachspezifische Fragen von Lebensmitteln tierischer Herkunft**

15. Sitzung am 18. und 19. Mai 2010 in Stuttgart	TOP:
Eingereicht von:	Brandenburg und Sachsen
Betreff:	Monitoring-Untersuchungen hinsichtlich des Vorkommens des Duncker'schen Muskelegels bei Wildschweinen
Anlagen:	Stellungnahme Nr. 027/2007 des BfR vom 1. Juli 2007 sowie entsprechendes Hand-Out des Instituts für Lebensmittelhygiene (Professur für Fleischhygiene) der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Erläuterungen:

In seiner Stellungnahme Nr. 027/2007 weist das BfR darauf hin, dass Wildschweinfleisch derzeit routinemäßig nicht auf das Vorkommen bzw. die „Abwesenheit“ des Duncker'schen Muskelegels (DME) untersucht werde. Gleichwohl werden DME im Rahmen der Untersuchung erlegter Wildschweine auf Trichinellen in bestimmten Regionen der Bundesländer MV, BB, ST und SN nicht selten nachgewiesen und die betreffenden Tierkörper beanstandet und gemäßregelt. Auch aus Schleswig-Holstein und Nordrhein-Westfalen liegen inzwischen entsprechende Befunde vor.

In diesem Zusammenhang stellte das BfR bereits 2007 fest, dass bei Verzehr von mit DME infiziertem, nicht ausreichend erhitztem Wildschweinfleisch Verbraucher an larvaler Alariose erkranken können. Daher solle Wildschweinfleisch bei entsprechendem Parasitennachweis nicht für den Verzehr freigegeben werden; vielmehr solle es untauglich beurteilt werden. Folgerichtig empfahl das BfR bereits im Jahre 2007, ein geeignetes Verfahren zum Nachweis des DME zu entwickeln, um dessen Vorkommen in Deutschland besser beurteilen zu können.

Ein solches Verfahren wurde inzwischen unter Federführung der Professur für Fleischhygiene der Universität Leipzig mit verschiedenen Kooperationspartnern entwickelt. Es basiert im Wesentlichen auf einem Larvenauswanderverfahren, welches mit der so genannten Baermann Methode vergleichbar ist.

Beschlussvorschlag:

Die AFFL dankt den an der Methodenentwicklung beteiligten Einrichtungen und Behörden. Sie befürwortet die Aufnahme entsprechender Monitoring-Untersuchungen, möglicherweise im Rahmen des BÜP 2010/2011. Sie bittet das BMELV, das BfR mit der Ausarbeitung entsprechender Eckpunkte hinsichtlich repräsentativer Probenzahlen, auszuwählender Regionen, einzusetzender Methoden sowie gegebenenfalls erforderlicher vorhergehender Ringversuche zu betrauen. Die

65. Arbeitstagung des ALTS 14.- 16. Juni 2010 in Berlin	TOP
Eingereicht von : (Vorname(n), Nachname(n), Behörde, Adresse der Behörde)	Katharina Riehn ¹ , Knut Große und Ernst Lücker ¹ ¹ Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig An den Tierkliniken 1 D-04103 Leipzig ² Stadt Brandenburg an der Havel Gesundheits-, Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt
Thema/Antrag:	Nachweis des Duncker'schen Muskelegels im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung mittels des modifizierten Larvenauswanderungsverfahrens (<i>Alaria alata</i> mesocercariae migration technique, AMT)
<p>Zusätzliche Informationen (0 Anlage/n):</p> <p>Seit der ersten Veröffentlichung von Funden des Duncker'schen Muskelegels (DME) in Wildschweinen im Land Brandenburg (Große und Wüste 2004) kommt es auf dem gesamten Gebiet der Bundesrepublik regelmäßig zu Meldungen über Nachweise dieses Parasiten in Wildfleisch. Meist handelt es sich hierbei um Zufallsbefunde, welche im Rahmen der amtlichen Trichinellenuntersuchung mithilfe des unter Anh. I, Kap. I der VO (EG) Nr. 2075/2005 beschriebenen Magnetrührverfahrens für die künstliche Verdauung von Sammelproben, erhoben werden. Eine spezifische Nachweismethode für <i>Alaria</i> spp. Mesozerkarien fehlte bislang und das Bundesinstitut für Risikobewertung wies in seiner Stellungnahme Nr. 027/2007 vom 1. Juli 2007 mit dem Hinweis auf eine mögliche Gefährdung der Verbraucher explizit auf die Notwendigkeit der Entwicklung eines geeigneten diagnostischen Verfahrens zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels hin (BfR 2006). Im Hinblick auf die Fleischuntersuchung bei frei lebendem Wild gem. Kap. VIII der Verordnung (EG) Nr. 854/2004 ist das Fleisch nicht nur im Falle des Vorkommens von Trichinellen, sondern auch dann für genussuntauglich zu erklären, wenn die Untersuchung auf Merkmale (einschließlich Parasitenbefall) hinweist, dass das Fleisch gesundheitlich bedenklich ist. Das BfR legte unter Bezugnahme auf die oben genannte Verordnung fest, dass für den Fall des Nachweises des Duncker'schen Muskelegels im Fleisch dieses aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes als untauglich für den menschlichen Verzehr beurteilt werden soll (BfR 2006).</p> <p>Eigene Stellungnahme:</p> <p>Erste eigene Untersuchungen (Riehn et al. 2010, Möhl et al. 2009) haben gezeigt, dass mit dem Magnetrührverfahren für die künstliche Verdauung von Sammelproben die Mesozerkarien von <i>Alaria</i> spp. nicht zuverlässig nachgewiesen werden können. Dies hat eine bisher unbekannte aber sicher nicht unerhebliche Zahl von falsch negativen Befunden zur Folge, was im Sinne eines vorbeugenden Verbraucherschutzes und der noch nicht abgeschlossenen Risikobewertung nicht zu akzeptieren ist. Besondere Probleme ergaben</p>	

sich in der Praxis bei der Beurteilung von DME-positiven Poolproben, bei denen eine Differenzierung der positiven Einzelproben nicht möglich ist. Weiterhin ist vor dem Hintergrund des Wegfalls der Möglichkeit zur trichinoskopischen Untersuchung von Haus- und Wildschweinen gemäß Anhang I Kapitel III der VO (EG) Nr. 2075/2005 seit dem 01.01.2010 mit einer erhöhten Anzahl positiver Proben zu rechnen.

Aus den genannten Gründen ergab sich die Notwendigkeit der Entwicklung einer geeigneten Nachweismethode zur sicheren Detektion der Mesozerkarien in verschiedenen Körpergeweben der paratenischen Wirte. Auf der Basis eigener Beobachtungen sowie Hinweisen aus der Literatur wurde eine alternative Nachweismethode für DME in verschiedenen Körpergeweben entwickelt. Die Methode basiert auf einem Larvenauswanderverfahren, welches mit der so genannten Baermann Methode vergleichbar ist. Das modifizierte Larvenauswanderverfahren zeigt im direkten Vergleich gegenüber dem Magnetrührverfahren für die künstliche Verdauung von Sammelproben eine um fast 60% gesteigerte Sensitivität und bietet eine einfach zu handhabende, robuste und preiswerte Methode zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels in verschiedenen Zielgeweben der paratenischen Wirte.

Beschlussvorschlag: Mit dem Ziel der Aufnahme der Methode in die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB soll das modifizierte Larvenauswanderverfahren (*Alaria alata mesocercariae migration technique, AMT*) zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels im Rahmen eines Ringversuches validiert werden.

Untersuchungen zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung (Poster)

L. Zeitler¹, A. Hamedy¹, K. Riehn¹, E. Lücker¹

Universität Leipzig, Institut für Lebensmittelhygiene

Seit der ersten Veröffentlichung durch Große und Wüste im Jahr 2004 zu Funden des Duncker'schen Muskelegels (DME) in Wildschweinen im Land Brandenburg kommt es in der gesamten Bundesrepublik regelmäßig zu Meldungen über Nachweise des Parasiten in Wildschweinfleisch. Meist handelt es sich hierbei um Zufallsbefunde, welche im Rahmen der amtlichen Trichinellenuntersuchung (in Anh. I, Kap. I der VO (EG) Nr. 2075/2005 beschriebenes Magnetrührverfahrens für die künstliche Verdauung von Sammelproben) erhoben werden. Eine spezifische Nachweismethode für *Alaria* spp. Mesozerkarien fehlte bislang und das Bundesinstitut für Risikobewertung wies in seiner Stellungnahme Nr. 027/2007 vom 1. Juli 2007 mit dem Hinweis auf eine mögliche Gefährdung der Verbraucher explizit auf die Notwendigkeit der Entwicklung eines geeigneten diagnostischen Verfahrens zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels hin (BfR 2006). Im Hinblick auf die Fleischuntersuchung bei frei lebendem Wild gem. Kap. VIII der Verordnung (EG) Nr. 854/2004 ist das Fleisch nicht nur im Falle des Vorkommens von Trichinellen, sondern auch dann für genussuntauglich zu erklären, wenn die Untersuchung auf Merkmale (einschließlich Parasitenbefall) hinweist, dass das Fleisch gesundheitlich bedenklich ist. Das BfR legte unter Bezugnahme auf die oben genannte Verordnung fest, dass für den Fall des Nachweises des Duncker'schen Muskelegels im Fleisch dieses aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes als untauglich für den menschlichen Verzehr beurteilt werden soll (BfR 2006).

Erste eigene Untersuchungen (Riehn et al. 2010, Möhl et al. 2009) haben gezeigt, dass mit dem Magnetrührverfahren für die künstliche Verdauung von Sammelproben die Mesozerkarien nicht zuverlässig nachgewiesen werden können. Aus diesem Grund ergab sich die Notwendigkeit der Entwicklung einer geeigneten Nachweismethode zur sicheren Detektion der Mesozerkarien im Wildschweinfleisch. Die eigenen Studien konzentrierten sich somit auf (a) die Entwicklung und Optimierung einer zuverlässigen Nachweismethode für *A. alata* Mesozerkarien und (b) die Untersuchung der Verteilung der Mesozerkarien im Wirtsgewebe und damit verbunden die Bestimmung potentieller Prädilektionsstellen im Wildschwein.

Mit Hilfe von Hinweisen aus der Literatur wurde eine effektive, robuste und kostengünstige Methode entwickelt, bei der die Mesozerkarien aus dem Probenmaterial aktiv in ein umgebendes flüssiges Medium auswandern und anschließend passiv absinken. Zur Optimierung des Verfahrens wurden fünf verschiedene Auswanderungsmedien, vier

verschiedene Zerkleinerungsgrade des Probenmaterials und vier unterschiedliche Auswanderungszeiten (Zeit, die die Mesozerkarien haben, um aus dem Material auszuwandern und abzusinken) getestet. An 100 positiven Proben wurde die Sensitivität der neu entwickelten Methode im Vergleich zum Referenzverfahren gem. VO (EG) 2075/2005 überprüft. Um die Verteilung der Mesozerkarien im Wildschwein und damit geeignete Prädilektionsstellen zur Untersuchung zu bestimmen, wurden 26 verschiedene anatomisch definierte Lokalisationen festgelegt und mit Hilfe des neuen Verfahrens auf DME untersucht. Das Projekt (Projektnummer 2808HS012) wird mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz und des Bundesinstituts für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) gefördert.

Alaria alata – Nachweis, Prävalenz und Risikobewertung

K. Riehn¹, K. Große², A. Hamedy¹, P. Kabelitz³, T. Wüste², L. Zeitler¹, E. Lücker¹

¹ Universität Leipzig, Institut für Lebensmittelhygiene

² Stadt Brandenburg an der Havel Gesundheits-, Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt, Klosterstraße 14, 14770 Brandenburg an der Havel

³ Landkreis Uckermark, Gesundheits- und Veterinäramt, Karl-Marx-Straße 1, 17291 Prenzlau

Alaria alata ist ein parasitischer Saugwurm aus der Familie *Diplostomidae*. Während die adulten Parasiten ausschließlich im Duodenum von Carnivoren (Caniden, Feliden, Musteliden) anzutreffen sind, können die Entwicklungsstufen des Parasiten neben ihren regulären Zwischenwirten (Wasserschnecken und Anuren) auch paratenische Wirte wie Amphibien, Reptilien, Vögel und Säugetiere befallen. Während der Befall bei Haustieren (vor allem Hausschweinen) heute eine untergeordnete Rolle spielt, ist der so genannte Duncker'sche Muskelegel (DME) im sylvatischen Zyklus weit verbreitet. Insbesondere Wildschweine sind häufig Träger der Parasiten. Bei Menschen hat der Verzehr von unzureichend erhitztem mesozerkarienhaltigem Wildfleisch und Froschschenkeln mehrfach schwerwiegende Erkrankungen verursacht, zum Teil mit Todesfolge. Seit dem Jahr 2004 wird der Parasit regelmäßig auf dem gesamten Gebiet der Bundesrepublik als Zufallsbefund im Rahmen der amtlichen Untersuchung von Schwarzwild auf *Trichinella* spp. nachgewiesen. Das Auftreten des Parasiten beim Wildschwein ist dabei eng an das Vorhandensein von Feuchtgebieten, in denen geeignete Zwischenwirte vorkommen, gekoppelt. Die Erkenntnisse zur Vorkommenshäufigkeit, zur Organverteilung im Tierkörper sowie zur geographischen Verteilung des DME waren bislang jedoch äußerst lückenhaft. Weiterhin fehlte bislang eine spezifische Nachweismethode für *Alaria* spp. Mesozerkarien und das Bundesinstitut für Risikobewertung wies in seiner Stellungnahme Nr. 027/2007 vom 1. Juli 2007 mit dem Hinweis auf das pathogene Potenzial des Parasiten explizit auf die Notwendigkeit der Entwicklung eines geeigneten diagnostischen Verfahrens zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels hin (BfR 2007). Da bislang nur unzureichende Informationen bezüglich der Gefährdung von Jagdausübenden und Verbrauchern vorliegen, empfiehlt das BfR Fleisch, in welchem die Mesozerkarien nachgewiesen wurden, als untauglich für den menschlichen Verzehr zu beurteilen (BfR 2007). Die eigenen, mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz und des Bundesinstituts für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) geförderten Untersuchungen (Projektnummer 2808HS012) gliedern sich in Anlehnung an die beschriebenen Fragestellungen in vier Hauptmodule:

- Entwicklung einer geeigneten Methode zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels in verschiedenen Zielgeweben und Optimierung derselben sowie Erarbeitung statistischer Kenngrößen im Rahmen der Validierung mit Hilfe eines Ringversuches,
- die Identifizierung der am besten geeigneten Probenentnahmestellen für den Nachweis des Duncker'schen Muskelegels mit Hilfe von Verteilungsuntersuchungen,
- die Erfassung der geographischen Häufigkeit des Vorkommens des Duncker'schen Muskelegels und seiner Befallsstärke in Wildbret sowie
- die aus den erarbeiteten Daten sich ermöglichende Bewertung des humanen Expositionsrisikos, das von mit dem Duncker'schen Muskelegel befallenen Fleisches ausgeht.

Weiterhin sollen phänotypisch differente Isolate von *Alaria* spp. Mesozerkarien genotypische charakterisiert, und Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der *Alaria*-Populationen mittels AFLP (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism)-Technik ausgewertet werden.

Parasitäre Zoonosen im Aufwind – eine Herausforderung für die Lebensmittelhygiene?

Katharina Riehn, Karsten Fehlhaber, Martina Ludewig, Ernst Lücker

Institut für Lebensmittelhygiene, Universität Leipzig

Lebensmittelassoziierte Parasiten können einerseits die Gesundheit des Verbrauchers gefährden oder schädigen, zum anderen können sie Veränderungen und Qualitätsmängel verursachen, die dazu führen, dass das Lebensmittel, auch ohne das Vorliegen einer konkreten Gesundheitsgefährdung, nicht mehr geeignet zum menschlichen Verzehr ist. In einigen Fällen reicht bereits die bloße Präsenz des Parasiten, um die Qualität eines Lebensmittels zu mindern oder ihm seine Verkehrs- und Verzehrbarkeit abzuspüren.

Wasser und Nahrungsmittel stellen für viele Protozoen und Helminthen einen wichtigen Übertragungsweg dar und über die Assoziation zwischen dem Verzehr von Nahrungsmitteln tierischer Herkunft und dem Auftreten bestimmter Erkrankungen des Menschen wurde lange spekuliert, letztendlich gelang der Beweis aber erst im 19. Jahrhundert. Nachdem Owen und Paget 1835 das Auftreten von *Trichinella* Larven im Diaphragma des Menschen beschrieben, wurde 1859/60 der komplette Lebenszyklus von *Trichinella spiralis* sowie der Zusammenhang zwischen trichinösem Fleisch und Erkrankungen des Menschen von Virchow, Leukart und Zenker demonstriert. Seit dieser Zeit ist der Parasit als Verursacher schwerer humaner Erkrankungen bekannt und schon 1863 wurden in Deutschland erste Vorschriften zur Untersuchung von Fleisch auf Trichinellen erlassen. Das heutige Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Prinzip konnte so im Grundsatz erstmals realisiert werden. Indes reicht die Geschichte der Erkrankung viel weiter zurück, was durch Larvenfunde in ägyptischen Mumien gezeigt werden konnte.

Trotz der langen und genauen Kenntnis lebensmittelassoziierter parasitärer Zoonosen nimmt die Lebensmittelparasitologie eher eine Außenseiterposition innerhalb der Lebensmittelhygiene ein und nur wenige Nachweisverfahren sind bis heute Standardisierungs- und Validierungsverfahren, vergleichbar denen der Mikrobiologie, unterzogen worden. Gründe hierfür sind vor allem in den komplizierten Vermehrungszyklen vieler Parasiten und den Schwierigkeiten bei der Herstellung von Standardmaterialien zu suchen. So wird die Lebensmittelparasitologie weniger als eigenständige wissenschaftliche Disziplin angesehen, sondern eher als eine „Subdisziplin“, eingeordnet zwischen Mikrobiologie und Zoologie. Weiterhin wird der Formenkreis der parasitär bedingten Erkrankungen des Menschen oftmals auf wenige Erreger reduziert. Viele der durch Parasiten ausgelösten Krankheitsbilder wurden und werden in den Kontext der Tropenmedizin gestellt, was dazu führt, dass die Symptome dieser Parasitosen von Ärzten entweder gar nicht erkannt oder einer bakteriell bzw. viral bedingten Erkrankung zugeschrieben werden, da

diese gegenüber den parasitären Erkrankungen im Hinblick auf die Volksgesundheit eine wesentlich höhere Bedeutung haben. Das führt in der Konsequenz zu einer, z.T. wohl erheblichen, Unterschätzung der tatsächlichen Erkrankungsfälle. Zudem finden durch die fortschreitende Klimaerwärmung als Vektoren fungierende Arthropodenarten, die bislang nur in Südeuropa heimisch waren, mittlerweile auch in unseren Breiten klimatisch günstigere Bedingungen vor. Das hat zur Folge, dass die Alpen ihre Gültigkeit als natürliche Nordgrenze des Vorkommens vieler parasitärer Infektionskrankheiten des Menschen höchstwahrscheinlich verlieren werden.

Gerade die beschriebenen Probleme sollten zu einer erhöhten Aufmerksamkeit gegenüber parasitären Zoonosen in der Produktion tierischer Lebensmittel führen, tatsächlich jedoch rücken diese Erkrankungen in den Industrienationen heute immer mehr aus dem Fokus des Interesses der Gesundheits- und Lebensmittelbehörden. Dies geschieht vor allem mit dem Hinweis auf die hohen Hygiene- und Produktionsstandards in der Lebensmittelindustrie, die umfassende gesundheitliche Aufklärung der Konsumenten und die damit verbundenen sinkenden Infektionsraten bei einigen dieser Erkrankungen. Betrachtet man auf der anderen Seite die immer weiter zunehmende Globalisierung in der Lebensmittelproduktion, den expandierenden internationalen Reiseverkehr, die verstärkte Migration in die Industrienationen und damit auch verbunden die Etablierung neuer Verzehrsgewohnheiten, sowie den demographischen Wandel in der Bevölkerung, so ergeben sich unter Umständen neue Risiken in Bezug auf diese lebensmittelassoziierten Parasitosen. In die Betrachtung dieser Risiken muss vor allem die Vielzahl der Wege einbezogen werden, über die Parasiten in Lebensmittel gelangen können. So können lebensmittelliefernde Tiere zum einen als Zwischenwirt für Parasiten dienen, zum anderen kann eine sekundäre Kontamination auch über infiziertes Personal, verunreinigtes Wasser und andere belebte und unbelebte Vektoren erfolgen. Gerade Lebensmittel, welche traditionell roh verzehrt werden oder nur einer Behandlung unterzogen werden, welche gerade die einzystierten Parasiten nicht abzutöten vermag, dürfen in diesem Zusammenhang als besonders sensibel gelten.

Kurzfassung der Forschungsergebnisse

Unsere Untersuchungen haben deutlich gezeigt, dass mit dem Referenzverfahren für die künstliche Verdauung von Sammelproben (Trichinella inspection method, TIM) die Mesozerkarien von *Alaria* spp. in Schwarzwild nicht zuverlässig nachgewiesen werden können. Aus diesem Grund ergab sich die Notwendigkeit der Entwicklung einer geeigneten Nachweismethode zur sicheren Detektion der Mesozerkarien in ihren paratenischen Wirten. Auf der Basis eigener Beobachtungen sowie Hinweisen aus der Literatur wurde eine alternative Nachweismethode für den Duncker'schen Muskelegel (DME) in verschiedenen Körpergeweben entwickelt. Die *Alaria alata* mesocercariae migration technique (AMT) basiert auf einem Larven-auswanderverfahren, welches die Detektion vitaler Mesozerkarien in verschiedenen Körpergeweben erlaubt. Falsch negative Befunde, die auf der unklaren Morphologie abgestorbener Mesozerkarien in der Verdauungsflüssigkeit sowie der Unverdaulichkeit von Fett und Bindegewebe beruhen, können somit weitestgehend vermieden werden. Das modifizierte Larvenauswanderverfahren zeigt im direkten Vergleich gegenüber der TIM eine um fast 60% gesteigerte Sensitivität und bietet eine einfach zu handhabende, robuste und preiswerte Methode zum Nachweis des DME. Durch den Einsatz dieser Methode können nun erstmals zuverlässige Daten bezüglich (1) der Verteilung des Parasiten im Tierkörper, (2) seiner Verbreitung in deutschen Schwarzwildbeständen und (3) zu seiner Tenazität gewonnen werden.

Die Untersuchungen zur Tenazität des DME mit der TIM haben zum Teil deutliche Unterschiede hinsichtlich der Widerstandsfähigkeit einzelner Isolate gegenüber verschiedenen physikalischen und chemischen Belastungen ergeben.

Die bislang gewonnenen Daten können als Ausgangspunkt für eine Risikobewertung und die eventuelle rechtliche Implementierung von Behandlungsverfahren für die Brauchbarmachung von Wildfleisch, welches mit dem DME infiziert ist, dienen. Gleichzeitig können die festgestellten Unterschiede auch als ein Hinweis auf eine bestehende Speziesdiversität in Westeuropa gewertet werden, was nach erfolgreicher Etablierung einer geeigneten molekularbiologischen Nachweismethode nun überprüft werden kann.

The prevalence of *Alaria alata* mesocercariae in German wild game populations

Ernst Lücker, Knut Große, Ahmad Hamedy, Petra Kabelitz, Lina Winkels, Tanja Wüste and Katharina Riehn

Introduction

Distomum musculorum suis (DMS), the mesocercarial stage of the trematode *Alaria alata*, can cause severe damages within their hosts. Since several reports about cases of human larval alariosis have been published, it became apparent that infected game animals, and in particular wild boars, are potential sources of infection. A final statement concerning the health risks for consumers could not be given due to the lack of information about both the prevalence of DMS and the suitability of *Trichinella* inspection methods to detect this parasite in wild boar meat. Thus our studies concentrated on (1) the verification of suitability of the official digestion methods for *Trichinella* spp. for DMS detection in wild boars (2) development, optimization and validation of methods, (3) the distribution of the parasites within their paratenic hosts, (4) the parasites prevalence within the German wild boar population, and (5) their tenacity against different chemical and physical influences.

Methods

940 individual samples/digests from 54 wild boars were analyzed by the official *Trichinella* inspection method (TIM) according to regulation (EC) No. 2075/2005. In addition to the official protocol a method modification with Pankreatin[®] and bile acid (Lipid digestion method, LDT) was applied for analysis of 89 adipose tissue samples from 12 animals. A new detection method, the *Alaria alata* mesocercariae migration technique (AMT) was developed on the basis of our results and used for detection of DMS in 1053 single samples from 54 wild boars. Furthermore the distribution patterns of DMS in wild boars in a total of 1377 single sample migrations/digestions from 35 positive animals were analyzed by application of all three methods and a survey based on a standardized questionnaire for the official veterinary inspection was conducted in order to collect information about the parasites prevalence in 413 German administrative districts.

Results

The TIM proved to be unsuited for the correct detection of DMS. It showed shortcomings in both digestion and suitability of samples. A direct comparison between the new AMT and TIM based on 574 single samples from 18 animals clearly showed that the sensitivity to

detect *Alaria alata* developmental stages in tissues of wild boars of the new method is nearly 60% higher when compared to TIM. Using all three methods (TIM, LDM and AMT) the distribution patterns of DMS in 35 DME positive wild boars were analyzed. The main results were: (i) DMS distributes heterogeneously within the paratenic host, (ii) DMS shows a differing distribution pattern in comparison with *Trichinella* spp. and (iii) DMS prefers localizations with considerable amounts of inter-/intramuscular connective and adipose tissue as well as glandular tissue and cartilage. Application of AMT also allowed the collection of first valid data about the parasites' tenacity against different chemical and physical influences (e. g. temperature, aw-value, nitrite curing salt (NCS)-concentration) and selected isolates have been identified molecular biologically by a newly developed *Alaria alata* PCR and characterized by application of AFLP.

Conclusions

AMT offers a very sensitive, highly applicable, fast, and cost effective way to detect DMS in wild boars. Application of this method will for the first time allow collection of full and accurate data about (i) this parasites' distribution within their paratenic hosts, (ii) the prevalence of DMS in German wild boar population and (iii) the assessment of its tenacity against different chemical and physical influences. On this basis the introduction of effective measures for consumer protection, and establishment of suitable legal prescriptions can be performed.

Acknowledgements

The study was financially supported by the Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection, Germany

Darstellung, Wertung sowie mögliche Umsetzung oder Anwendung der Ergebnisse in Bezug auf den bei Einholung des Projektantrags angegebenen Forschungsbedarf

Seit der ersten Veröffentlichung von Funden des Duncker'schen Muskelegels (DME) in Wildschweinen im Land Brandenburg im Jahr 2004 kommt es auf dem gesamten Gebiet der Bundesrepublik regelmäßig zu Meldungen über Nachweise dieses Parasiten in Wildfleisch. Meist handelt es sich hierbei um Zufallsbefunde, welche im Rahmen der amtlichen Trichinellenuntersuchung mithilfe des unter Anh. I, Kap. I der VO (EG) Nr. 2075/2005 beschriebenen Referenzverfahrens (official Trichinella inspection method, TIM), erhoben werden. Eine spezifische Nachweismethode für *Alaria* spp. Mesozerkarien fehlte bislang und das Bundesinstitut für Risikobewertung wies in seiner Stellungnahme Nr. 027/2007 vom 1. Juli 2007 mit dem Hinweis auf eine mögliche Gefährdung der Verbraucher explizit auf die Notwendigkeit der Entwicklung eines geeigneten diagnostischen Verfahrens zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels hin.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens sollte demzufolge geklärt werden, ob mit den derzeit verfügbaren amtlichen parasitologischen Untersuchungsmethoden (auf Trichinellen) ein zuverlässiger Erregernachweis möglich ist. Falls dies nicht der Fall sein sollte, ist eine sichere parasitologische Nachweismethode zu entwickeln. Weiterhin sollten die für den Nachweis des Duncker'schen Muskelegels am besten geeigneten Lokalisation für die Probenentnahme beim Wildschwein festgelegt und die Prävalenz des Duncker'schen Muskelegels in Wildschweinen, unter besonderer Berücksichtigung von potentiell endemischen Gebieten erfasst werden. Auf der Basis der gewonnenen Daten soll eine Bewertung der Relevanz des Erregers für die Gesundheit des Menschen vorgenommen werden.

Die im Rahmen des Forschungsvorhabens durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass mit der TIM die Mesozerkarien nicht zuverlässig nachgewiesen werden können. Insbesondere fiel auf, dass die Reproduzierbarkeit des Verfahrens unter vergleichbaren Bedingungen sehr schlecht ist. So war es nur in 70% der untersuchten Fälle (n=40) möglich, ein positives Ergebnis im Rahmen einer zweiten Analyse zu bestätigen. Die Unzulänglichkeiten der Methode zeigten sich hier zum einen bei der Auswahl des Probenmaterials, da die vom Duncker'schen Muskelegel präferierten fett- und bindegewebsreichen Körperpartien durch den HCl/Pespin Verdau nicht ausreichend verdaut werden können, zum anderen starben durch die eingesetzten HCl/Pespin Konzentrationen zahlreiche Parasiten während der Untersuchung ab und zeigten schon nach kurzer Zeit erhebliche Zersetzungserscheinungen, was die Diagnostik stark behinderte.

Aus diesem Grund ergab sich die Notwendigkeit der Entwicklung einer geeigneten Nachweismethode zur sicheren Detektion der Mesozerkarien im Wildschweinfleisch. Die Methodenentwicklung konnte erfolgreich innerhalb der Laufzeit des Projektes abgeschlossen werden und erste Untersuchungen haben gezeigt, dass das neu entwickelte modifizierte Larvenauswanderverfahren zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels (*Alaria alata* mesocercariae migration technique, AMT) gegenüber dem Magnetrührverfahren für die künstliche Verdauung von Sammelproben eine um etwa 60% gesteigerte Sensitivität aufweist. Die Methode wurde im April 2010 in der internationalen Fachzeitschrift „Parasitology Research“ veröffentlicht (Vol. 107(1), S. 213-220).

Die parallel durchgeführten Untersuchungen zur Verteilung des Parasiten im Tierkörper haben ergeben, dass sich die Parasiten offenbar sehr heterogen im Körper der paratenischen Wirte verteilen und dass sich das Verteilungsmuster grundlegend von dem von *Trichinella* spp. unterscheidet. Gleichzeitig wurde deutlich, dass DME Lokalisationen mit hohen Anteilen von inter- und intramuskulärem Fett- und Bindegewebe sowie Knorpel- und Drüsengewebe bevorzugt. Die Probennahme sollte demnach bevorzugt an verschiedene Lokalisationen der kaudoventralen Kopfregion, die quergestreifte Muskulatur, Fett- und Bindegewebe, Drüsengewebe und lymphatisches Gewebe umfassen, am Peritoneum mit retroperitonealem Fettgewebe, dem Zwerchfellpfeiler, dem Larynx mit anhaftendem Bindegewebe, der Zunge und der Kaumuskulatur (*Mm. masseter, temporalis, pterygoidei*) erfolgen.

Die bisher erfassten Daten zur Prävalenz zeigen, dass der Duncker'sche Muskelegel bis lang vor allem in den wasser- und sumpfreichen Gebieten der neuen Bundesländer auftritt. Hier ist sowohl bei den Endwirten, als auch bei den paratenischen Wirten mit einer hohen Durchseuchung und mit hohen Befallszahlen zu rechnen. Nichtsdestoweniger zeigen die per Fragebogen erhobenen Daten, dass zunehmend auch Gebiete in den alten Bundesländern, die ein entsprechendes Landschaftsprofil aufweisen, betroffen sind. Einschränkend muss hier allerdings erwähnt werden, dass die fragebogenbasierte Umfrage zum Vorkommen des Duncker'schen Muskelegels sich nahezu ausschließlich auf Ergebnisse stützt, die mittels des Magnetrührverfahrens im Rahmen der amtlichen Trichinellenuntersuchung von Schwarzwild erhoben wurden. Demnach ist hier von einer erheblichen Untererfassung der tatsächlichen Befallsstärke und unter Umständen auch der geographischen Verteilung des Parasiten auszugehen.

Durch den Einsatz der neuentwickelten AMT besteht nun erstmals die Möglichkeit diese Wissenslücken zu schließen. Erste vergleichende Analysen haben gezeigt, dass sich die AMT aufgrund ihrer ausgesprochen hohen Sensitivität und Wiederfindungsrate einerseits als Referenzverfahren für den Nachweis des Duncker'schen Muskelegels in Fleisch anbietet und sich andererseits, auf Grund des ausgesprochen geringen Kosten- und Zeitaufwandes für

die Durchführung der Methodik, auch als Schnellmethode für den Einsatz in der amtlichen Überwachung eignen könnte. Der flächendeckende Einsatz der AMT innerhalb der amtlichen Überwachung würde, vor allem auch in Verbindung mit der von der Länderarbeitsgemeinschaft Verbraucherschutz, Arbeitsgruppe Fleisch- und Geflügelfleischhygiene und fachspezifische Fragen von Lebensmitteln tierischer Herkunft (AFFL) vorgeschlagene Aufnahme entsprechender Monitoring-Untersuchungen, erstmals die Erfassung der tatsächlichen Prävalenz und Infektionsstärke ermöglichen. Verbunden mit einer Erweiterung der bisherigen Untersuchungen zur Verteilung der DME im Tierkörper und zur Tenazität des Parasiten könnten so die Daten für eine abschließende Bewertung des Bundesinstituts für Risikobewertung geliefert werden.

Zusätzlich könnte auf dieser Basis die rechtliche Grundlage einer angemessenen fleischhygienerechtlichen Beurteilung erarbeitet werden, die die zurzeit herrschende Rechtsunsicherheit bei der Beurteilung DME positiver Stücke beseitigen würde. Eine solche rechtliche Grundlage kann, unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Tenazitätsuntersuchungen, auch ein zugelassenes Behandlungsverfahren für die Brauchbarmachung von Wildfleisch, welches mit dem Duncker'schen Muskelegel infiziert ist, enthalten. In der Folge könnten damit erhebliche Unsicherheiten im vorbeugenden Verbraucherschutz sowie wirtschaftliche Verluste vermieden werden.

Der Einsatz der AMT innerhalb der Routinediagnostik setzt jedoch die Validierung der Methode im Rahmen von Ringversuchen voraus, in denen zum einen die Eignung der eingesetzten Standardmaterialien überprüft und zum anderen die Optimierung der Untersuchungsmethode sowie die Erarbeitung statistischer Kenngrößen ermöglicht werden. Im Ergebnis würde mit der AMT ein validiertes Referenz- und Routineverfahren verfügbar werden.

Die Ergebnisse der Verteilungs- und Tenazitätsstudien sowie der Identifizierung von Speziesunterschieden auf morphologischer und insbesondere molekularbiologischer Ebene können dann als Grundlage einer Erfassung der genetischen Diversität innerhalb der europäischen *Alaria alata*-Population mithilfe der AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)-Analyse eingesetzt werden.