

Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben¹

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

Weiterführung der Methodenentwicklung zur Diagnostik des Duncker'schen Muskelegels (2810HS017)

Kurztitel: Methodenentwicklung zur DME Diagnostik

Zuwendungsempfänger/

Ausführende Stellen: **Universität Leipzig, Veterinärmedizinische Fakultät**
Institut für Lebensmittelhygiene
An den Tierkliniken 1
D-04301 Leipzig
Projektleitung
Prof. Dr. Ernst Lücker (luecker@vmf.uni-leipzig.de)
Tel.: 0341-97-38222, -38223, Fax: -38249
Dr. Katharina Riehn (katharina.riehn@haw-hamburg.de)
Tel.: 040428756368

Forschungsprojekt Nr.: **2808HS017**

Laufzeit: **01.09.2010-28.02.2013**

¹ Stand 22.08.2013 krahel

Berichtszeitraum: 01.09.2010-28.02.2013

Wissenschaftliche Kooperation

Name	Institution
Dr. Knut Große, DVM Tanja Wüste	Stadt Brandenburg an der Havel Gesundheits-, Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Klosterstraße 14 14770 Brandenburg an der Havel
Dr. Karsten Nöckler	Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Nationales Referenzlabor für Trichinella Diedersdorferweg 1 12277 Berlin
Prof. Dr. Thomas Alter	Königsweg 69 Raum 024 14163 Berlin
Prof. Dr. Edoardo Pozio	Istituto Superiore di Sanità International Trichinella Reference Centre 299 Viale Regina Elena 00161 - Rom Italien
Dr. Gudrun Wibbelt, Zaida Melina Rentería-Solís	Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung Alfred-Kowalke-Str. 17 10315 Berlin
Dr. Nikolay Lalkovski	National Diagnostic and Research Veterinary Institute Pencho Slaveikov blvd.15 1606 Sofia, Bulgaria

Autoren und Mitarbeiter

Ahmad Hamedy, Kathrina Riehn, Lina Winkels, Jasem Saffaf, Hiromi Gonzalez Fuentes, Gregor Makrutzki und Ernst Lücker

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	9
1 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts	10
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 Lebenszyklus	13
1.2.3 Die transmammäre Übertragung	15
1.2.4 Wirte der Mesozerkarie	16
1.2.5 Pathogenität und humane Infektionen	19
1.2.6 Tenazität	24
1.2.7 Geographische Verbreitung – Prävalenz	26
1.2.8 Nachweisverfahren	29
1.2.9 Verbraucherschutz	32
2 Materialien und Methoden	35
2.1 Optimierung des neu entwickelten Verfahrens	35
2.1.1 Testung verschiedener Medien	35
2.1.2 Testung verschiedener Zerkleinerungsgrade	36
2.1.3 Testung verschiedener Auswanderungszeiten	37
2.2 Ringversuch	39
2.2.1 Weiterführung eines Ringversuches für die Optimierung der Untersuchungsmethode	39
2.2.2 Auswahl geeigneter Laboratorien und Kontaktaufnahme	39
2.2.3 Auswahl des am besten geeigneten Materials und einer geeigneten Methode zur Herstellung der Standardmaterialien.	40
2.2.4 Möglichkeiten der Beschaffung einer ausreichenden Anzahl natürlich infizierter paratenischer Wirte zur Herstellung des Probenmaterials.....	41
2.2.5 Erstellung von Unterlagen für die Datenerfassung	41
2.2.6 Erstellung eines Zeitplans	41
2.2.7 Isolierung von vitalen <i>Alaria alata</i> Mesozerkarien aus natürlich infizierten paratenischen Wirten	41
2.2.8 Probenvorbereitung.....	41
2.2.9 Homogenitätstest	41
2.2.10 Kennzeichnung, Zwischenlagerung und Versand der Proben	42
2.2.11 Die <i>Alaria alata mesocercariae</i> migration technique (AMT)	42
2.3 Prävalenz und Prädilektionsstellen.....	45
2.3.1 Probenbeschaffung (bei Anfall DME-positiver Stücke)	45
2.3.2 Probennahme	45
2.3.3 Untersuchung der Proben	45
2.4 Tenazität.....	46
2.4.1 Fleischprodukte.....	46

2.4.2	Tenazität gegenüber Natriumchlorid, Ethanol und Pepsin	53
2.4.3	Tenazität gegenüber Temperatur und Mikrowelle und Trocknung	54
2.5	Molekularbiologische Identifizierung und Differenzierung	56
2.5.1	Nachweis der <i>Alaria alata</i> mittel PCR	57
3	Ergebnisse	65
3.1	Optimierung des neu entwickelten Verfahrens	65
3.1.1	Testung verschiedener Medien	65
3.1.2	Testung verschiedener Zerkleinerungsgrade	65
3.1.3	Testung verschiedener Auswanderungszeiten	66
3.2	Ringversuch	67
3.2.1	Ringversuch Teil I	67
3.2.2	Ringversuch Teil II	70
3.2.3	Ringversuch Teil III	73
3.2.4	Ringversuch Teil IV	76
3.3	Prävalenz	79
	Weitere Ergebnisse	84
3.3.1	Untersuchungen zur Verteilung des DME im Wildschwein	87
3.4	Tenazität	92
3.4.1	Wildschwein- / Waschbar-Schinken	92
3.4.2	Wildschwein- und Waschbär-Salami	94
3.4.3	Kurzgereifte Rohwürste (Knacker) aus Waschbärenfleisch	97
3.4.4	Salzkonzentration	98
3.4.5	Ethanol-Konzentration	99
3.4.6	Pepsin-Lösungen	99
3.4.7	Einfluss der Temperatur	99
3.4.8	Mikrowellenbehandlungen	101
3.4.9	Trocknung	102
3.5	Molekularbiologische Identifizierung und Differenzierung	103
3.5.1	Nachweis der <i>Alaria alata</i> mittel PCR	103
3.5.2	Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	105
3.6	Vorraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	107
4	Zusammenfassung	109
4.1	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	111
5	Literaturverzeichnis	113
6	Anlagen	129
6.1	Unterlagen zur Durchführung des Ringversuchs	129
6.2	Veröffentlichung “ <i>Alaria alata</i> in wild boars (<i>Sus scrofa</i> , Linnaeus, 1758) in the eastern parts of Germany”	129
6.3	Veröffentlichung First detection of <i>Alaria alata mesocercariae</i> in a wild boar (<i>Sus scrofa</i> Linnaeus, 1758) in Bulgaria	129
6.4	<i>Alaria alata mesocercariae</i> in raccoons (<i>Procyon lotor</i>) in Germany	129
6.5	Tenacity of <i>Alaria</i> spp. <i>mesocercariae</i> isolates in different home-made German meat products	129

6.6	First interlaboratory test for the detection of <i>Alaria</i> spp. mesocercariae in meat samples using the <i>Alaria</i> spp.mesocercariae migration technique (AMT)	129
6.7	Development of a PCR approach for differentiation of <i>Alaria</i> spp. mesocercariae	129
6.8	Durchführung eines Ringversuches zur Validierung der <i>Alaria</i> alata mesocercariae migraton technique (AMT).....	129

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus von <i>A. alata</i> (MÖHL et al. 2009).....	13
Abbildung 2: <i>Alaria alata</i> Mesozerkarien in 5 ml HCL/Pepsin – Verdauungsflüssigkeit aus einem Sammelansatz zur Untersuchung von Fleischproben auf <i>Trichinella</i> spp. nach Anhang I, Kapitel I der VO (EG) Nr. 2075/2005. Die Mesozerkarien waren nach Einsetzen in die Verdauungslösung keiner Wärmequelle und keinem Magnetprüher ausgesetzt (RIEHN et al. 2010).	31
Abbildung 3: Darstellung des Versuchsaufbaus zur Durchführung der <i>Alaria alata</i> mesocercariae migration technique (AMT)	44
Abbildung 4: Herstellungsverfahren und Varianten der Trockenpökeln von Rohschinken aus Wildschwein- und Waschbärenfleisch.....	47
Abbildung 5: Verfahren zur Trockenpökellung und Kalträucherung von Wildschweinschinken	48
Abbildung 6: Flussdiagramm mit Verfahrensschritten zur Trockenpökellung von Waschbärenschinken	49
Abbildung 7: Herstellungsverfahren und verwendete Ausgangsmaterialien bei der Herstellung von Salami-Würsten	50
Abbildung 8: Flussdiagramm zum Verfahren über die Herstellung von Rohwürsten (Salami) aus infiziertem Fleisch von Wildschweinen und Waschbären.	51
Abbildung 9: Herstellungsverfahren bei der Produktion von kurzgereiften Rohwürsten (Knacker) unter Verwendung verschiedener Ausgangsmaterialien.	52
Abbildung 10: Flussdiagramm zum Herstellungsverfahren von kurzgereiften Rohwürsten (Knacker) aus infiziertem Wildschwein- und Waschbärenfleisch.....	52
Abbildung 11: Vorbereitete Fleischstücke (Wildschwein) zur Dotierung von <i>A. alata</i> -Larven.....	55
Abbildung 12: Beimpfte Fleischproben (Wildschwein) nach Verschluss des Stanzloches.....	55
Abbildung 13: Verwendete Mikrowelle zur industriellen Bestrahlung von Lebensmitteln	56
Abbildung 14: Anzahl ausgewanderter Larven in unterschiedlichen Medien	65
Abbildung 15: Anzahl ausgewanderter Larven bei verschiedenen Zerkleinerungsgraden	66
Abbildung 16: Anzahl ausgewanderter Larven nach 30, 60, 90 und 240 Minuten	66
Abbildung 17: Ergebnis der qualitativen Auswertung der im Rahmen des Ringversuches an die Teilnehmer versendeten Proben	68
Abbildung 18: Aufschlüsselung der Fehlerhäufigkeiten (Abweichung von Larven-Sollwert) bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben	68
Abbildung 19: Abweichung der Ringversuchsteilnehmer vom Larven-Sollwert bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben	69

Abbildung 20: Zusammenfassende Darstellung der Laborperformance bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben	70
Abbildung 21: Ergebnis der qualitativen Auswertung der im Rahmen des Ringversuches an die Teilnehmer versendeten Proben	71
Abbildung 22: Aufschlüsselung der Fehlerhäufigkeiten (Abweichung von Larven-Sollwert) bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben	71
Abbildung 23: Abweichung der Ringversuchsteilnehmer vom Larven-Sollwert bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben	72
Abbildung 24: Zusammenfassende Darstellung der Laborperformance bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben. Die Markierung zeigt den Cut-Off von 21 (70 %) der 30 eingesetzten Larven.	73
Abbildung 25: Ergebnis der qualitativen Auswertung der im Rahmen des Ringversuches an die Teilnehmer versendeten Proben	74
Abbildung 26: Aufschlüsselung der Fehlerhäufigkeiten (Abweichung von Larven-Sollwert) bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben	74
Abbildung 27: Abweichung der Ringversuchsteilnehmer vom Larven-Sollwert bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben	75
Abbildung 28: Zusammenfassende Darstellung der Laborperformance bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben. Die Markierung zeigt den Cut-Off von 21 (70 %) der 30 eingesetzten Larven.	76
Abbildung 29: Ergebnis der qualitativen Auswertung der im Rahmen des Ringversuches an die Teilnehmer versendeten Proben	77
Abbildung 30: Aufschlüsselung der Fehlerhäufigkeiten (Abweichung von Larven-Sollwert) bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben	77
Abbildung 31: Abweichung der Ringversuchsteilnehmer vom Larven-Sollwert bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben	78
Abbildung 32: Zusammenfassende Darstellung der Laborperformance bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben. Die Markierung zeigt den Cut-Off von 21 (70 %) der 30 eingesetzten Larven.	78
Abbildung 33: Befallshäufigkeit der definierten Körperregionen im Wildschwein bei 142 untersuchten Tieren.....	87
Abbildung 34: Befallshäufigkeit der definierten Körperregionen im Wildschwein bei 142 untersuchten Tieren, Anzahl positiver Tiere in in Prozent	88

Abbildung 35: Befallsstärke der definierten Körperregionen im Wildschwein bei 142 untersuchten Tieren, Larven in 30 g Gewebe	88
Abbildung 36: Rohschinken hergestellt aus infiziertem Wildschweinfleisch einen Tag nach der Produktion.	93
Abbildung 37: Wildschweinschinken am Tag 5 nach Herstellung.	93
Abbildung 38: Langereifte Rohwürste (Salami) hergestellt aus artifiziell infiziertem Wildschweinfleisch am Tag der Herstellung.....	95
Abbildung 39: Langereifte Rohwürste (Salami) hergestellt aus infiziertem Waschbärenfleisch am Tag der Herstellung.	96
Abbildung 40: Langgereifte Rohwürste (Salami) am 5. Tag nach der Herstellung. Links: Waschbärenfleisch. Rechts: Wildschwein.....	96
Abbildung 41: Kurzgereifte Rohwurst "Knacker" aus infiziertem Waschbärfleisch	97
Abbildung 42: Überlebensrate (in Tagen) von <i>A. alata</i> -Mesozerkarien in Abhängigkeit von der Salzkonzentrationen	98
Abbildung 43: Verdächtige tote <i>Alaria alata</i> mit AMT isoliert	104
Abbildung 44: Verdächtige <i>Alaria alata</i> im histologischen Präparat.....	104
Abbildung 45: Bestätigung der <i>Alaria alata</i> aus Waschbären mittels PCR.....	104
Abbildung 46: Bandenmuster der AFLP-Typisierung.....	105
Abbildung 47: Bandenmuster der AFLP-Typisierung.....	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wirte der Mesozerkarie von <i>Alaria</i> spp.	17
Tabelle 2: Tabelle 2: Medien – Tierdaten	35
Tabelle 3: Zerkleinerungsgrade – Tierdaten.....	36
Tabelle 4: Zeiten – Tierdaten	38
Tabelle 5: An das Institut für Lebensmittelhygiene überstellte Wildschweine:	80
Tabelle 6: Nachweis von <i>Alaria alata</i> Entwicklungsstadien in Waschbären	84
Tabelle 7: Nachweis von <i>Alaria alata</i> Entwicklungsstadien in verschiedenen Wildtieren	86
Tabelle 8: Verteilung des DME im Wildschwein	89
Tabelle 9: Ergebnisse der Überlebensfähigkeit von <i>A.alata</i> -Mesozerkarien in Rohschinken aus artifiziiell infiziertem Wildschweinfleisch (Variante 1).	94
Tabelle 10: Ergebnisse der Überlebensfähigkeit von <i>A.alata</i> -Mesozerkarien in Rohschinken aus infiziertem Waschbärenfleisch (Variante 2).	94
Tabelle 11: Ergebnisse der Versuch zur Überlebensfähigkeit von <i>A.alata</i> -Mesozerkarien in gereiften Rohwürsten (Salami) aus infiziertem Waschbärenfleisch und artifiziell infiziertem Wildschweinfleisch	97
Tabelle 12: Versuchsergebnisse zur Überlebensfähigkeit von <i>A.alata</i> -Mesozerkarien in kurzgereiften Rohwürsten (Knacker) aus infiziertem Waschbärenfleisch	98
Tabelle 13: Einwirkung von Salzkonzentration	99
Tabelle 14: Einfluss der Temperatur	100
Tabelle 15: Resistenz von <i>A.alata</i> -Mesozerkarien gegenüber Kühlung	100
Tabelle 16: Einfluss der Behandlung von infiziertem Fleisch mit Mikrowellenstrahlen auf die Vitalität von <i>A. alata</i> Mesozerkarien.....	101
Tabelle 17: Einfluss der Trocknung auf die Vitalität von <i>A. alata</i> -Mesozerkarien.....	102

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Die Ziele und Aufgabenstellung des Projektes sind in der Leistungsbeschreibung (Zuwendungsbescheid der BLE „Forschungsvorhaben „Weiterführung der Methodenentwicklung zur Diagnostik des Duncker’schen Muskelegels (2810HS017)“ definiert:

Seit dem Jahr 2004 kommt es auf dem gesamten Gebiet der Bundesrepublik regelmäßig zu Meldungen über Nachweise von Mesozerkarien des parasitären Saugwurms *Alaria alata* in Wildfleisch. Bedingt durch ihr breitgefächertes Nahrungsspektrum sind insbesondere Wildschweine häufig Träger der Parasiten. Bei Menschen hat der Verzehr von unzureichend erhitztem mesozerkarienhaltigem Wildfleisch und Froschschenkeln mehrfach schwerwiegende Erkrankungen verursacht, zum Teil mit Todesfolge. Die Erkenntnisse zur Vorkommenshäufigkeit, zur Organverteilung im Tierkörper sowie zur geographischen Verteilung des DME waren bislang jedoch lückenhaft. Weiterhin fehlte bislang eine spezifische Nachweismethode für *Alaria* spp.

Mesozerkarien. Durch die Entwicklung der *Alaria alata* mesocercariae migration technique (AMT) steht nun erstmals eine Methode zur Verfügung, mit welcher die Mesozerkarien in den verschiedenen Geweben der paratenischen Wirte sicher identifiziert werden können (s. Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben 2808HS012).

Ziel des Forschungsvorhabens ist somit neben der Validierung und Optimierung dieser Methode im Ringversuch und der damit verbundenen Entwicklung von geeigneten Standardmaterialien der Einsatz der AMT innerhalb einer bundesweit durchgeführten Prävalenzstudie. Durch den flächendeckenden Einsatz einer validierten Methode zum Nachweis des Duncker’schen Muskelegels besteht hier erstmals die Möglichkeit die tatsächliche Befallssituation in deutschen Wildtierbeständen zu klären.

Des weiteren werden Tenazitätsversuche durchgeführt, welche zum einen eine bessere Bewertung des humanen alimentären Expositionsrisikos, insbesondere im Hinblick auf verarbeitete Wildprodukte, zulassen, zum anderen aber auch gemeinsam mit den Ergebnissen der morphologischen Untersuchung die Grundlage für die Identifizierung von Speziesunterschieden auf molekularbiologischer Ebene bilden.

Die **Arbeitsziele** des Forschungsvorhabens wurden entsprechend der im Antrag formulierten Meilensteine sowie des Zuwendungsbescheides folgendermaßen definiert:

- **Optimierung der AMT** (Zur Optimierung der Methode wurden drei verschiedene Kriterien, das Auswanderungsmedium, der Zerkleinerungsgrad der Probe und die Auswanderungszeit, in denen die Mesozerkarien auswandern und absinken können, genauer betrachtet.)
- **Validierung** der AMT (Methodik zur Herstellung von Standardmaterialien, Workshop, Ringversuche, einschließlich statistische Analyse)
- **Prävalenzstudie** einschließlich Verteilung der Mesozerkarien im Hinblick auf die Probennahme
- **Tenazität** die Überprüfung der Tenazität der Mesozerkarien gegenüber verschiedenen physikalischen und chemischen Parametern im Hinblick auf das alimentäre humane Expositionsrisiko.
- **Molekularbiologie/genetische Diversität**: Identifizierung von Speziesunterschieden auf morphologischer und insbesondere molekularbiologischer Ebene und Erfassung der genetischen Diversität innerhalb der europäischen *Alaria alata* Population mithilfe der AFLP-Analyse.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Für den Berichtszeitraum vom Projektbeginn im September 2010 bis zum Termin der Abgabe des Schlussberichts am 28. Februar 2013 wurden in Anlehnung an die oben aufgeführten wissenschaftlichen Arbeitsziele die nachfolgend näher beschriebenen Arbeitsschritte durchgeführt:

- die Eignungsprüfung und Optimierung der Nachweismethode für *Alaria alata* Mesozerkarien (AMT) in Wildfleisch;
- Durchführung und Abschluss von Ringversuchen für die Validierung der Untersuchungsmethode sowie für die Erarbeitung statistischer Kenngrößen im Rahmen der Validierung;
- die Identifizierung der am besten geeigneten Probenentnahmestellen für den Nachweis des Duncker'schen Muskelegels mit Hilfe von Verteilungsuntersuchungen;
- die Überprüfung der Tenazität der Mesozerkarien gegenüber verschiedenen physikalischen und chemischen Parametern im Hinblick auf das alimentäre humane Expositionsrisiko;
- 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;

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

1.2.1 Einleitung

Der Mensch stellt neben verschiedenen anderen Säuger-, Reptilien- und Amphibienarten einen paratenischen Wirt der Trematode *Alaria alata* dar. Im Lebenszyklus von *A. alata* ist neben den obligatorischen Wirten dieser paratenische Wirt als fakultatives Wirtsstadium integriert. Diese Wirte werden vom mesozerkarialen Stadium des Parasiten befallen, das im deutschsprachigen Raum nach dem Erstbeschreiber auch als *Duncker'scher Muskelegel* (DME) bezeichnet wird (DUNCKER 1881b, 1896).

Die Verbreitung des Parasiten in Deutschland scheint nach bisherigen Untersuchungen besonders die östlichen Bundesländer zu betreffen. Eine seit 2002 stetig steigende Anzahl an zufälligen Funden in Wildschweinfleisch im Rahmen der routinemäßigen Trichinellenuntersuchung (TU) macht eine Bewertung des potentiellen Infektionsrisikos für den Menschen notwendig (GROßE und WÜSTE 2004; BfR 2007; MÖHL et al. 2009).

So ist der Befall des Menschen mit der Mesozerkarie von *Alaria* spp., die *humane Alariose*, im amerikanischen Raum von mehreren Autoren beschrieben und kann zu unterschiedlich schweren Symptomen bis zum Tod führen (BYERS und KIMURA 1974; KRAMER et al. 1996; MCDONALD et al. 1994, BEAVER et al. 1977; FERNDANDES et al. 1976; FREEMANN et al. 1976; SHEA et al. 1973). Auch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) weist darauf hin, dass eine Gefährdung des Menschen nicht auszuschließen ist. Eine abschließende Bewertung des humanen Expositionsrisikos ist indes aufgrund der lückenhaften Daten zu Prävalenz und Biologie des Parasiten noch nicht möglich. Aus diesem Grund empfiehlt das BfR im Sinne eines vorbeugenden Verbraucherschutzes, Fleisch im Falle eines Nachweises des Duncker'schen Muskelegels als untauglich für den menschlichen Verzehr zu beurteilen (BfR 2007).

Der wichtigste Punkt im Rahmen des Verbraucherschutzes ist der sichere Nachweis des Parasiten in Lebensmitteln tierischer Herkunft, was nach bisherigem Kenntnisstand vor allem Wildschweinfleisch betrifft. Eine spezifische und evaluierte Methode für den Nachweis des Parasiten in Fleisch fehlt jedoch bislang. Die Detektion mit Hilfe der TU ist für den Nachweis des DME nicht evaluiert und aufgrund der biologischen Unterschiede zwischen *Trichinella* spp. und *Alaria* spp. fragwürdig. So wandert beispielsweise der DME, im Gegensatz zu den in Kapseln liegenden Trichinellen, aktiv im Gewebe des Wirts (ODENING 1963). Weiterhin sind Funde des DME überwiegend in Fettgewebe und intermuskulärem Bindegewebe beschrieben (CORT 1918, DICK und LEONARD 1979, ODENING 1961b, PEARSON 1956, SHOOP et al. 1990, SHOOP et al. 1983a, KIMBER und KOLLIAS 2000, BUGGE 1942a, SUDARIKOV 1960). Die Verwendung von reinen Muskelproben wie bei der TU gefordert erscheint daher für die Probengewinnung unzweckmäßig.

1.2.2 Lebenszyklus

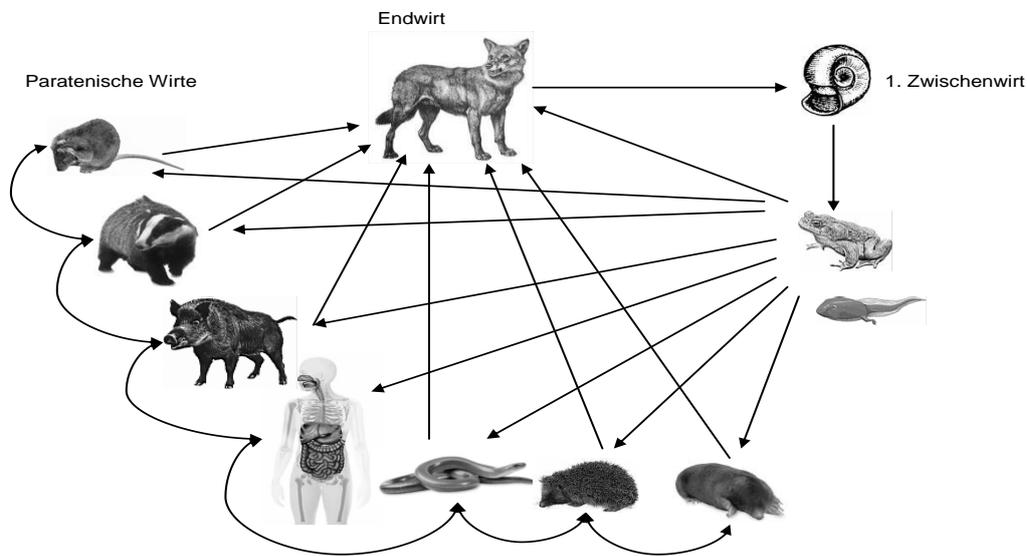


Abbildung 1: Lebenszyklus von *A. alata* (MÖHL et al. 2009)

Der adulte Egel parasitiert im Darm des Endwirtes und legt nicht embryonierte Eier, die über den Kot des Wirtes in der Umwelt verteilt werden. Die Entwicklung vom Ei zum ausgewachsenen Individuum dauert durchschnittlich 92-114 Tage (LUCIUS et al. 1988). Wenn das Ei ins Wasser gelangt schlüpft daraus das Mirazidium (ODENING 1961a; HIEPE 1985). Diese dringen aktiv in einen aquatilen Schneckenwirt ein. In diesem ersten Zwischenwirt entwickelt sich die Mirazidie über multiple Vermehrung (HIEPE 1985) weiter und nach etwa einem Jahr der Reifung geben Tochttersporozysten die mit einem gegabelten Schwanz ausgestatteten Zerkarien frei (Furkozerkarie). Diese bewegen sich lebhaft im freien Wasser und dringen dann aktiv in einen zweiten Zwischenwirt ein, wobei sie ihren Schwanz abwerfen. Wie Tabelle 4 zeigt, kann der zweite Zwischenwirt eine Kaulquappe bzw. ein adulter Frosch oder eine andere Amphibienart sein (BUGGE 1942b). Hier entwickelt sich die Furkozerkarie zur Mesozerkarie.

Während die Mitglieder des Genus *Strigaea* einen obligaten 4 - Wirtszklus haben, hat *Alaria* spp. einen 3 - Wirtszklus mit einem fakultativen, mesozerkarialen Stadium zwischen der Zerkarie und der Metazerkarie. Die Erstbeschreibung dieser Art des Lebenszyklus und der Begriff „Mesozerkarie“ wurden von Bosma festgelegt (BOSMA 1934). Die Mesozerkarie ist eine Art „Wartestadium“, das sich durch Penetrationsdrüsen auszeichnet.

Die Verteilung im Körper der Kaulquappe bzw. des Frosches war bei experimentell infizierten Tieren heterogen, bei natürlich infizierten Fröschen konzentrierten die Mesozerkarien sich dagegen in den Schenkeln und der seitlichen Mundhöhle (PEARSON 1956). Pearson konnte auch feststellen,

dass sich die Mesozerkarien nach dem Tod des Wirtes langsam weiter bewegen und aus dem Gewebe in umgebendes Wasser abwandern Abbildung 1.

Das Spektrum der Schnecken, Frösche und Amphibien und die Präferenz zu einem bestimmten Wirt variiert je nach *Alaria* Spezies. In den Fröschen liegen die Mesozerkarien je nach Spezies entweder in Gruppen, frei zwischen den Muskelbäuchen oder einzeln in Zysten, wobei die Zysten aus Wirtsgewebe gebildet werden (HOFER und JOHNSON 1970).

Die Mesozerkarie wird durch Aufnahme des infizierten zweiten Zwischenwirtes auf den paratenischen Wirt oder direkt auf den Endwirt übertragen. Der paratenische Wirt dient hierbei lediglich als „Wartewirt“. Der Begriff „hôtes d`attente“ (= Wartewirt/Stapelwirt) wurde als erstes von Joyeux und Baer beschrieben (JOYEUX und BAER 1934). In diesen Stapel- oder Reservewirten können die Parasitenlarven überleben, jedoch keine weitere Entwicklung vollziehen. Eine Ausnahme stellt *A. mustelae* der Untergattung *Paralaria* dar. Diese *Alaria* Spezies hat sich bei Versuchen in Mäusen und Hühnern innerhalb weniger Tage von der Mesozerkarie zur Metazerkarie weiterentwickelt, während dieser Entwicklungsschritt bei den anderen *Alaria* - Spezies allein auf den Endwirt beschränkt ist (MADSEN und JOHNSON 1974).

Der paratenische Wirt wird von anderen Autoren auch als „Transport“ oder „Hilfszwischen“ Wirt bezeichnet (WALLACE 1939; CUCKLER 1949; BAER 1951), da sich die Mesozerkarien in diesen Wirten durch jeden Verzehr ansammeln und die Infektion vom im Wasser lebenden Wirten auf landlebende Wirte übertragen (DÖNGES 1969). Die Larve verändert sich weder morphologisch, noch verliert sie die Invasionsfähigkeit gegenüber ihrem Endwirt (ODENING 1961b; ODENING 1960; ODENING 1963) und kann so mehrere Wirtswechsel unbeschadet überstehen. SHOOP und CORKUM (1984c) gehen von einer Körperwanderung des Parasiten im paratenischen Wirt vom Magen ins Unterhautfettgewebe aus, wo sie als aktiv wandernde Stadien verbleiben.

Während diese Wirte nicht essentiell für die Entwicklung des Parasiten sind, sind sie doch nützlich für die Verbreitung der Infektion. Der Zwischenwirt, in dem sich die obligate Entwicklung der Parasitenlarve vollzieht, gehört z.B. nicht immer zum Nahrungsspektrum des Endwirts, wohingegen einige paratenische Wirte dies tun. Auf der anderen Seite kann es auch sein, dass der paratenische Wirt nicht zum Nahrungsspektrum des Endwirtes gehört, so dass er sich für den Parasiten als Sackgasse herausstellt („cul-de-sac“) (PEARSON 1956). Im paratenischen Wirt durchläuft der Parasit eine transenteralsomatische Wanderung (ODENING 1963), bei der die Mesozerkarie durch die Darmwand in die Bauchhöhle und dann weiter in die Muskulatur vor allem der vorderen Körperhälfte und/oder an oder in die unterschiedlichen Organe wandert (HIEPE 1985).

Eine weitere Möglichkeit ist die Invasion der Milchdrüsen von graviden paratenischen Wirten (SHOOP und CORKUM 1981). Hierüber werden dann nach der Geburt die säugenden Jungtiere infiziert. Im Gegensatz dazu ist eine transplazentare Übertragung der Mesozerkarien vom Mutter-

tier auf das Ungeborene nach bisherigen Erkenntnissen nicht möglich (SHOOP und CORKUM 1983b).

Die weitere Entwicklung der Mesozerkarie erfolgt ausschließlich im Körper des Endwirts. Laut ODENING (1963) kommen nur Vertreter der Caniden für *A. alata* als Endwirte in Frage. Aktuellere Studien zeigen jedoch, dass auch andere Carnivoren (Felidae, Mustelidae) als Endwirte für diesen Parasiten dienen können. Nach der oralen Aufnahme eines infizierten Hilfs- oder obligaten zweiten Zwischenwirtes durch den Endwirt, vollzieht die Mesozerkarie eine zyklische, transenteropulmonale Wanderung (ODENING 1963). Durch diese Wanderung im Gewebe können auch bei Endwirten im Rahmen einer Sektion mesozerkariale Stadien von *Alaria* spp. gefunden werden. Im Magen angekommen durchdringt die Mesozerkarie die Magenwand, durchquert die Bauchhöhle Richtung Zwerchfell und passiert dieses. Durch die Brusthöhle gelangt sie in die Lunge. Nach Erreichen der Lunge wandelt sich die Mesozerkarie in die Metazerkarie um, wandert die Trachea hoch, wird dort abgeschluckt und entwickelt sich im Dünndarm zum adulten Wurm (beschrieben von Pearson für *A. arisaemoides* und *A. canis*, von Savinov für *A. alata* und von Johnson für *A. marciana*) (SAVINOV 1953a, CUCKLER 1940; CUCKLER 1949; PEARSON 1956; ODENING 1963; JOHNSON 1968; HIEPE 1985; SCHNIEDER 2006). Angaben über die Dauer der Entwicklung im Endwirt liegen für *A. marciana* in Katzen zwischen 14 (CUCKLER 1940; CUCKLER 1949) und 15 Tagen (SHOOP und CORKUM 1983a), für *A. alata* in Caniden bei 35 Tagen (SAVINOV 1953b) und für *A. canis* in Caniden bei 34 Tagen (PEARSON 1956).

Eine von einigen Autoren ebenfalls in Betracht gezogene Möglichkeit der Verteilung der Mesozerkarien im Wirtskörper ist der Weg durch den Blutkreislauf. Bei experimentell infizierten Hauskatzen wiesen SHOOP und CORKUM (1983a) Mesozerkarien in Herz und Leber nach. Sie gehen jedoch davon aus, dass es sich hier nicht um den bevorzugten, aktiv gewanderten Weg der Larven handelt, da er keinerlei Schäden an den Gefäßen oder der Leberkapsel fand, sondern dass die Larven passiv verteilt wurden. PEARSON (1956) fand Mesozerkarien im Blut der Leber eines experimentell mit *A. canis* infizierten Fuchses. Auch IASTREB et al. (2005) wies Mesozerkarien im Blut von Hunden und Katzen nach. ALLEN und MILLS (1971) gehen ebenfalls davon aus, dass die Mesozerkarien die Lunge unter anderem über die hintere Hohlvene und die rechte Herzkammer auf dem Blutweg erreichen.

1.2.3 Die transmammäre Übertragung

Die vertikale Übertragung ist bei 38 Helminthenspezies beschrieben (SHOOP 1991). Die Ursachen für die Anreicherung der Larven in den Milchdrüsen sind noch nicht abschließend geklärt. MILLER (1981) geht davon aus, dass es sich um einen hormonellen Stimulus handelt, der die Larven zur Änderung ihres gewohnten Weges veranlasst. Die Infektion von Neugeborenen über die Muttermilch durch Mesozerkarien der Spezies *Alaria* wurde von SHOOP und CORKUM (1984c) bei Kat-

zen (Endwirt) und Mäusen (paratenischer Wirt) belegt. Auch bei Florida-Panthern (*Puma concolor*) und Coyoten (*Canis latrans*) wurde sie nachgewiesen (PENCE et al. 1988; FOSTER et al. 2009). SHOOP und CORKUM (1981) teilt die transmammäre Übertragung in drei Typen ein: Typ A sind paratenische Wirte (auch als „euparatenische Wirte“ bezeichnet), wie z.B. die Maus, bei der einige Mesozerkarien über die Milch auf die Jungtiere übertragen werden und sich dort als Mesozerkarien im Körper verteilen. Typ B sind sogenannte „amphiparatenische“ Wirte (SHOOP 1991), wie z.B. der Waschbär, bei dem ebenfalls einige Mesozerkarien über die Milch auf die Jungtiere übertragen werden, sie sich im Jungtier dann aber zu adulten Parasiten weiterentwickeln, was sie zu keiner Zeit im adulten Wirtstier tun. Der adulte Waschbär ist somit ein paratenischer Wirt, wohingegen das Jungtier als Endwirt dient. Typ C sind die Endwirte, die gleichzeitig auch amphiparatenische Wirte sind, bei denen nicht alle Mesozerkarien in die Lunge und dann weiter in den Darm wandern und sich ausdifferenzieren, sondern einige als Mesozerkarien mit der Milch auf die Jungtiere übergehen und sich dann dort zu adulten Parasiten entwickeln (SHOOP und CORKUM 1983b). SHOOP und CORKUM (1984c) zeigten, dass auch Primaten amphiparatenische Wirte sind. In einem Infektionsversuch wiesen sie nach, dass die Affenmutter die Infektion an mehrere nachfolgende Generationen über die Milch weitergibt. Sie stellten auch fest, dass die adulten Primaten als paratenische Wirte, die Jungtiere aber zusätzlich als Endwirte dienen. Seiner Einschätzung nach sollten daher Frauen, die mit Mesozerkarien infiziert sind, darauf hingewiesen werden, dass die Möglichkeit der Übertragung auf ihre Nachkommen über die Muttermilch besteht (SHOOP et al. 1990). Eine einmal infizierte Frau könnte den Parasiten an all ihre gestillten Kinder weitergeben und auch ihre weiblichen Nachkommen gäben die Infektion auf die gleiche Weise an ihre Kinder weiter (SHOOP und CORKUM 1984c).

1.2.4 Wirte der Mesozerkarie

Die in Tabelle 1 gezeigte Übersicht über die bislang bekannten Wirte der Mesozerkarie von *Alaria* spp. zeigt das breite Wirtsspektrum dieses Parasitenstadiums.

Bislang gibt es keine gesicherten Untersuchungen darüber, ob auch Fische als paratenische Wirte für *Alaria* spp. dienen. PEARSON (1956) verfütterte in einem Infektionsversuch Mesozerkarien von *A. canis* an Goldfische. Drei Tage *post infectionem* fand er in der Bauchhöhle alle Mesozerkarien abgestorben und in verschiedenen Stadien der Verkapselung. Kein Parasit wurde in den Eingeweiden oder der Muskulatur gefunden. Der Autor schloss daraus, dass der Goldfisch nicht als paratenischer Wirt für die Mesozerkarien von *Alaria* spp. in Frage kommt. Auch SHOOP und CORKUM (1981) wies bei keiner der acht von ihm untersuchten Fischarten (*Dorosoma cepedianum*, *Fundulus chrysotus*, *Gambusia affinis*, *Ictalurus*

Tabelle 1: Wirte der Mesozerkarie von *Alaria* spp.

<ul style="list-style-type: none"> • Amphibien 	<ul style="list-style-type: none"> • Reptilien 	<ul style="list-style-type: none"> • Säugetiere
<ul style="list-style-type: none"> • Ordnung Anura • - <i>Rana kl. esculenta</i> (Teichfrosch), <i>R. temporaria</i> (Grasfrosch), <i>R. fusca</i> (Brauner Grasfrosch), <i>R. arvalis</i> (Moorfrosch), <i>R. catesbeiana</i> (Amerikanischer Ochsenfrosch), <i>R. clamitans</i> (Schreiefrosch), <i>R. utricularia</i> (Südlicher Leopardfrosch), <i>R. pipiens</i> (Leopardfrosch) • - <i>Hyla chrysoscelis</i> (Copes Grauer Laubfrosch), <i>H. cinerea</i> (Amerikanischer Laubfrosch) • - <i>Bufo bufo</i> (Erdkröte), <i>B. calamita</i> (Kreuzkröte), <i>B. viridis</i> (Wechselkröte) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ordnung Squamata • - <i>Agkistrodon piscivorus</i> (Wassermokassinotter), <i>Coluber constrictor</i> (Schwarznatter), <i>Lampropeltis getulus</i> (Kettennatter), <i>Nerodia cyclopion</i> (Grüne Schwimmnatter), <i>N. erythrogaster</i> (Rotbauch-Kukrinatter), <i>N. fasciata</i> (Gebänderte Wassernatter), <i>Thamnophis proximus</i> (Westliche Bändernatter), <i>T. cyrtopsis cyrtopsis</i> (Schwarznacken Strumpfbandnatter), <i>Natrix natrix</i> (Ringelnatter), <i>Coronella austriaca</i> (Schlingnatter), <i>Vipera berus</i> (Kreuzotter) • - <i>Lacerta vivipara</i> (Waldeidechse), <i>L. agilis</i> (Zauneidechse) • - <i>Anolis carolinensis</i> (Chamäleon) • Ordnung Crocodylia • - <i>Alligator mississippiensis</i> (Alligator) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ordnung Carnivora • - <i>Procyon lotor</i> (Waschbär), <i>Lontra Canadensis</i> (Nordamerikanischer Flussotter), <i>Lutra lutra</i> (Eurasischer Flussotter), <i>Mustelidae</i> (Marder), <i>Mephitidae</i> (Stinktief), <i>Meles meles</i> (Europäischer Dachs), <i>Taxidae taxus</i> (Silberdachs), <i>Ursidae</i> (Bär), <i>Puma concolor</i> (Florida-Panther), <i>Felis silvestris catus</i> (Hauskatze), <i>Canis familiaris</i> (Haushund) • Ordnung Didelphimorphia • - <i>Didelphis virginiana</i> (Opposum) • Ordnung Eulipotyphla • - <i>Erinaceidae</i> (Igel), <i>Talpa euopaea</i> (Europäischer Maulwurf) • Ordnung Rodentia • - <i>Mus musculus</i> (Maus) • Ordnung Primates • - <i>Macaca mulatta</i> (Rhesusaffe) • Ordnung Artiodactyla • - <i>Sus scrofa</i> (Wildschwein), <i>Sus scrofa domestica</i> (Hausschwein)

punctatus, *Lepisosteus gulosus*, *Micropterus salmoides*, *Pomoxis annularis*) Mesozerkarien nach. Es ist jedoch bekannt, dass Larven von Diplostomatidae zeitweise die Linse und den Glaskörper von Fischeaugen befallen (ASHTON et al. 1969; LEIBOVITZ et al. 1980). So wiesen RIIS et al. (1981) lebende verkapselte Mesozerkarien im periokulären Gewebe, der Kornea, der Sklera und in der Iris eines Austerfroschfisches (*Opsanus tau*) nach. Eine genaue Speziesdifferenzierung wurde jedoch nicht durchgeführt.

In der Klasse der Amphibien dienen dagegen viele Arten nachweislich als paratenische Wirte für die Mesozerkarien von *Alaria* spp.. SHOOP und CORKUM (1981) wiesen bei fünf verschiedenen Froscharten (*Hyla chrysoscelis*, *H. cinerea*, *Rana catesbeiana*, *R. clamitans*, *R. utricularia*) mit einer Prävalenz von 66,3 % Mesozerkarien von *A. marciana*e nach. Auch die Mesozerkarien von *A. alata* wurden bei mehreren Froscharten (*Rana kl. esculenta*, *R. temporaria*, *R. fusca*, *R. arvalis*) und drei Krötenarten (*Bufo bufo*, *B. calamita*, *B. viridis*) nachgewiesen (BUGGE 1942; POTEKHINA 1951; SHIMALOV und SHIMALOV 2001b; ANDREAS 2006). Zahlreiche Reptilien gehören ebenfalls zum Wirtsspektrum der Mesozerkarien. SHOOP und CORKUM (1981) wiesen bei 87 % der von ihnen untersuchten Schlangen (*Agkistrodon piscivorus*, *Coluber constrictor*, *Farancia abacura*, *Lampropeltis getulus*, *Nerodia cyclopion*, *N. erythrogaster*, *N. fasciata*, *Regina rigida*, *Thamnophis proximus*) Mesozerkarien von *A. marciana*e nach. Sie fanden in nahezu allen Organen Mesozerkarien, jedoch mit einer Präferenz für die Fettkörper der Schlangen. Auch GOLDBERG und BURSEY (2002) isolierten Mesozerkarien von *Alaria* spp. aus dem Oesophagus von Schwarznacken – Strumpfbandnattern (*Thamnophis cyrtopsis cyrtopsis*). Die Mesozerkarien von *A. alata* wurden in drei heimischen Schlangenarten (*Natrix natrix*, *Coronella austriaca*, *Vipera berus*) (SHIMALOV und SHIMALOV 2000b) und zwei Eidechsenarten (*Lacerta agilis*, *L. vivipara*) (LEWIN 1992; SHIMALOV et al. 2000a) nachgewiesen. SHOOP und CORKUM (1981) infizierten darüber hinaus erfolgreich experimentell ein Chamäleon (*Anolis carolinensis*) und einen Alligator (*Alligator mississippiensis*).

Bei den Säugetieren dienen unterschiedlichste Arten aus verschiedenen Ordnungen als Wirte der Mesozerkarie (Kurzfassung siehe Tabelle 1, ausführliche Fassung in Tabelle 5 im Anhang). SHOOP und CORKUM (1981) fanden natürliche Infektionen mit den Mesozerkarien von *A. marciana*e bei Waschbären (*Procyon lotor*) und Opossums (*Didelphis virginiana*) und infizierten Labormäuse und Katzen (SHOOP und CORKUM 1987) erfolgreich experimentell. FOSTER et al. (2009) wiesen *A. marciana*e Mesozerkarien in den Lungen von drei neugeborenen Florida Pantern nach. Der Überträger der *A. marciana*e – Infektion des Florida Panthers ist nach Einschätzung der Autoren der Waschbär (*Procyon lotor*). Mesozerkarien von *A. canis* wurden beim Nordamerikanischen Fischotter und Mesozerkarien von *A. taxidea*e beim Silberdachs nachgewiesen (PEARSON 1956; WITTROCK und ULMER 1974). IASTREB et al. (2005) erwähnen Infektionen mit Mesozerkarien von *A. alata* bei streunenden Hunden und Katzen, bei Igel, Fischottern, Mäusen, Maulwürfen, Mardern und beim Stinktief. Auch beim Europäischen Dachs und beim Eurasischen

Fischotter wurden Infektionen mit *A. alata* Mesozerkarien nachgewiesen (BUGGE 1943; SHIMALOV et al. 2000b). Das Wildschwein dient den Mesozerkarien von *A. alata* ebenfalls als paratenischer Wirt. So wurden in Deutschland seit Ende des 19. Jahrhunderts immer wieder Mesozerkarien als Nebenbefund im Rahmen der amtlichen Trichinellenuntersuchung festgestellt. Beim Wildschwein scheint vor allem das intermuskuläre Binde- und Fettgewebe der Kehlkopf-, Zwerchfell-, Zwischenrippen- und Bauchmuskulatur befallen zu sein (DUNCKER 1881a; DUNCKER 1896; BAARS 1942; BUGGE 1942a; HASSLINGER und NAGLER 1969). BAARS (1942) stellte bei der Untersuchung histologischer Präparate große, bindegewebig ausgekleidete Hohlräume fest, in denen Larven lagen. Er bezeichnete sie als Bohrgänge der Parasiten. WILLACH (1892a; 1892b) fand bereits Ende des 18. Jahrhunderts in der Lunge von Pferden und in der gesamten Körper- und Hautmuskulatur von Bullen Knötchen mit grüngelblichem, käsigem Inhalt und einem bis mehreren Parasiten, die er mit den Beschreibungen Dunckers für den Muskelegel verglich, und darauf schloss, dass es sich bei seinen Funden ebenfalls um Muskelegel handelte. Da er die Funde nicht sicher identifizieren konnte, bezeichnet er die Parasiten als „Distomenbrut“. ODENING (1961a) zeigte in einem Versuch, dass es möglich ist, Mesozerkarien auf einen Rhesusaffen zu übertragen. Dabei fütterte er dem Affen 40 Mesozerkarien, wovon er 38 Tage später bei der Sektion des Affen 30 Mesozerkarien v. a. im Fett- und Bindegewebe der vorderen Körperhälfte und im Bereich des Halses wiederfand. Er beschreibt, dass die Larven in glasklaren, dünnwandigen Zysten bereits mit bloßem Auge oder mit Hilfe einer Lupe zu erkennen waren. Der Autor geht aufgrund seiner Untersuchungen davon aus, dass auch der Mensch als paratenischer Wirt in Frage kommt.

1.2.5 Pathogenität und humane Infektionen

Bei zahlreichen Tieren beobachtete PEARSON (1956) bei massivem Befall mit Mesozerkarien eine diffuse fibröse Reaktion im Wirtsgewebe. Einige Mesozerkarien waren von dünnem, fibrösem Gewebe eingekapselt. Häufig können jedoch keine Gewebereaktionen oder Einkapselungen festgestellt werden, da die Parasiten das Gewebe durchwandern und so der direkten Wirtsreaktion entgehen (SHOOP und CORKUM 1984a). Die Penetrationsfähigkeit der Muskelegel im Gewebe des Wirtes nach der Aufnahme konnte anhand von histologischen Schnittpräparaten von befallenem Gewebe eines natürlich infizierten Schweines sicher festgestellt werden (BAARS 1942). SHOOP und CORKUM (1981) testeten die Penetrationsfähigkeit der Mesozerkarien von *A. marciana* gegenüber der Haut von Säugetieren an Mäusen und dem Unterarm eines Menschen. Es wurde jedoch über einen Zeitraum von 30 Minuten kein Eindringen beobachtet und die Mesozerkarien starben schließlich ab. Bei einem Versuch mit laktierenden Mäusen zeigten SHOOP und CORKUM (1984c), dass die Mesozerkarien von *A. marciana* die interlobulären Septen im Gesäuge durchdringen und dabei deutliche Gänge zurückbleiben in denen die Larven zwischen den einzelnen Lobuli wandern. Sie zeigten zudem, dass sich die Larven in den Milchdrü-

sen entlang der Fettzellen im Bindegewebe bewegen. Alle Larven lagen im distalen Bereich der Milchdrüse in der Nähe der Zitzen. Die Autoren stellten fest, dass die Larven sich mit ihrem Bauchsaugnapf am Wirtsgewebe festhalten, um dann mit ihrem Mundsaugnapf raspelnde Bewegungen durchzuführen und sich so im Gewebe fortzubewegen. Lokale Entzündungsreaktionen um die Mesozerkarien und Eosinophilie fehlten, es wurden lediglich eine diffuse Infiltration mit Neutrophilen und geringgradig vergrößerte Lymphknoten nachgewiesen. SHOOP und CORKUM (1984c) gehen von einer somatischen Wanderung der Larven aus, um die Milchdrüsen zu erreichen, da die Larven das Gewebe und die Septen durchdringen können und in keinem Blutgefäß gefunden wurden. Das Fehlen einer Immunantwort um die Larve erklären sie sich durch die schnelle Fortbewegung des Parasiten im Gewebe, wodurch er einer lokalen Reaktion sozusagen „davonläuft“. Auch der Weg entlang der Fettzellen minimiert den Kontakt zu Blutbestandteilen, was zur Vermeidung einer direkten Immunreaktion führt. Die diffuse Infiltration mit Neutrophilen erklären sich die Autoren durch die hochgradige Zerstörung der Alveolen. Die vergrößerten Lymphknoten deuten darauf hin, dass das Immunsystem des Wirtes auf den Parasiten reagiert.

Lange Zeit wurde angenommen, dass der Duncker'sche Muskelegel in Wildschweinen keine Gefahr für den Verbraucher darstellt (OSTERTAG und SCHÖNBERG 1955; LERCHE et al. 1957; BEUTLING 2004). ODENING (1961a) wies jedoch anhand eines experimentell infizierten Primaten nach, dass die Mesozerkarien von *Alaria alata* sich im Körper eines Primaten ebenso verhalten wie in paratenischen Säugetierwirten. Auch HASSLINGER und NAGLER (1969) wiesen auf die potentielle Pathogenität des Parasiten für den Menschen hin. Vermutungen über die Möglichkeiten einer Infektion des Menschen durch die orale Aufnahme von DME-positivem Schweinefleisch äußerten auch SAVINOV (1954) und SUDARIKOV (1959). Die meisten Trematodeninfektionen gehen mit einer Eosinophilie und einer Erhöhung der IgE – Werte einher (LÖSCHER und SONNENBURG 2005), was darauf schließen lässt, dass eine generalisierte anaphylaktische Reaktion durch die wiederholte orale Aufnahme von infiziertem Material ausgelöst werden kann. Die Symptome eines anaphylaktischen Schocks reichen von Tachykardie und Blutdruckabfall bis zu vasomotorischen Zusammenbruch und Bewusstlosigkeit (BORK 1999; EGGER 2005). Die bei humaner Alariose beschriebenen klinischen Symptome sind unterschiedlichster Art, von leichten respiratorischen und kutanen Symptomen bis zu diffuser unilateraler subakuter Neuroretinitis (DUSN) und anaphylaktischem Schock mit letalem Ausgang (FALLIS et al. 1973; SHEA et al. 1973; BYERS und KIMURA 1974; WALTERS et al. 1975; FERNANDES et al. 1976; FREEMAN et al. 1976; BEAVER et al. 1977; MCDONALD et al. 1994; KRAMER et al. 1996; HEDGES 2000; BIALASIEWICZ 2000). Aufgrund der potentiellen Infektiosität der Mesozerkarien gegenüber dem Menschen zählt die sogenannte „larvale Alariose“ zu den Zoonosen (SMYTH 1995).

Infektionen der Haut mit Mesozerkarien beschreiben zwei Autoren. BEAVER et al. (1977) berichteten von einem 43 Jahre alten Mann aus Louisiana, der innerhalb von drei Wochen zweimal wegen einer jeweils etwa 1x1 cm großen Umfangsvermehrung der Haut am Oberschenkel und an der

Hüfte vorstellig wurde. In beiden Fällen musste ein „Wurm“ entfernt werden. Dieser wurde als eine Mesozerkarie der Unterfamilie *Alariae* identifiziert. Auf Nachfrage stellte sich heraus, dass der Patient etwa drei Monate vorher Waschbär und andere Wildtiere wie Reh, Kaninchen und Eichhörnchen gegessen hatte. KRAMER et al. (1996) berichteten von der Infektion mit Mesozerkarien eines 38jährigen Mannes. Der Kalifornier zeigte etwa zwei Wochen nach einem Kanadurlaub, bei dem er nach eigenen Angaben unzureichend erhitztes Wildgansfleisch gegessen hatte, sporadischen Hautausschlag, Bronchospasmus und Eosinophilie. Die Behandlung mit oralen Antihistaminika und inhalierten Kortikosteroiden führte zwei Monate später zu einer Besserung der Symptome. Ein Jahr später wurde der Patient erneut vorstellig. Es wurde ein subkutaner Knoten an der Brust des Patienten festgestellt, aus dem nach Eröffnung eine Larve isoliert werden konnte. Anamnestisch wurde ein etwa vier Monate zurückliegender Verzehr von Froschschenkeln nachgewiesen. Es konnte nicht geklärt werden, ob die Infektion durch das bereits ein Jahr zuvor verzehrte Wildgansfleisch oder die Froschschenkel verursacht wurde und auch die Mesozerkarie konnte nicht sicher identifiziert werden, es handelte sich jedoch nach der Meinung des Autors mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Larve von *Alaria* spp..

Infektionen des Auges in Zusammenhang mit der larvalen Alariose wurden am häufigsten festgestellt. BIALASIEWICZ (2000) erwähnt *Alaria* spp. Mesozerkarien als einen möglichen Parasiten, der durch Migration in das Auge (Larva-migrans-Syndrom) eine DUSN (Diffuse unilaterale subakute Neuroretinopathie) auslösen kann. Die Übertragung erfolgt seiner Einschätzung nach über Frösche und Schlangen und kommt v. a. in den USA und Ostasien vor. Dabei können die Mesozerkarien sowohl intravitreal, intraretinal als auch subretinal liegen. Durch die Wanderung des Parasiten und die damit verbundene Gewebeerstörung entstehen sogenannte „chorioretinale Straßen“ auf dem Augenhintergrund. Dabei kann der Parasit im Auge bis zu 3 Jahre überleben. Bei der Diagnose muss auf die mögliche Fluchtreaktion des Wurms durch das helle Licht der Spaltlampe geachtet werden. Die Angaben zur medikamentösen Therapie in der Literatur sind widersprüchlich. Die Therapie mit Kortikosteroiden wird empfohlen. Anthelminthika können den Visusverlust und die Optikusatrophie meist jedoch nicht aufhalten. Bei der chirurgischen Therapie wird v. a. die Photokoagulation des Wurmes mit einem Laser empfohlen. Der Parasit kann aber auch direkt aus dem vorderen Glaskörper aspiriert werden. Subretinale Würmer können nach Inzision der Retina und Mobilisierung mittels eines Hakens mit einer intraokularen Pinzette extrahiert werden (BIALASIEWICZ 2000).

MCDONALD et al. (1994) berichteten von zwei humanen Augeninfektionen, bei denen Mesozerkarien von *Alaria* als auslösender Faktor identifiziert wurden. Betroffen war ein 35jähriger asiatischer Mann aus San Francisco, der im November 1989 wegen schlechten Sehvermögens seines rechten Auges vorstellig wurde. Es stellte sich heraus, dass die Einschränkung der Sehkraft bereits seit zwei bis drei Jahren bestand. In seinem Auge wurden meanderförmige, pigmentierte, linienartige Narben in der Retina, retinale Blutungen, Retinitis und eine gelbe, abgrenzbare, sich

bewegende Masse, identifiziert als Larve, auf dem pigmentierten Epithel gefunden. Der Parasit wurde mit einem Laser photokoaguliert, woraufhin die Symptome verschwanden. Der zweite Patient war ein 38jähriger, asiatisch stämmiger Mann, ebenfalls aus San Francisco, der im April 1988 wegen verschwommener Sicht auf seinem linken Auge vorstellig wurde. Bei ihm zeigten sich Vaskulitis, fokale Retinitis, Papillitis, intraretinale Blutungen und Vitreitis. Es wurde jedoch keine Larve gefunden. Nach wiederholter Behandlung wurde 21 Monate nach der ersten Vorstellung eine bewegliche, grau-weiße Zyste mit einem Parasiten im Inneren in der vorderen Augenkammer gefunden. Im Februar 1990 wurde die Zyste durch eine Vitrektomie entfernt, woraufhin die Symptome verschwanden. Bei beiden Patienten geht der Autor von einer Infektion über den Verzehr von unzureichend erhitzten Froschschenkeln aus, da beide den Verzehr von Froschschenkeln in asiatischen Restaurants bestätigten, jedoch keinen Kontakt zu rohem Froschfleisch hatten (MCDONALD et al. 1994).

SHEA et al. (1973) berichteten von der Infektion des linken Auges einer 29jährigen Frau aus Ontario, Kanada, mit einer *Alaria* Mesozerkarie. Die Larve wurde jedoch nur optisch als Mesozerkarie identifiziert, weitere Diagnostik wurde nicht vorgenommen. Die Patientin wurde aufgrund von intermittierenden Sehproblemen des linken Auges über 6 Jahre im Dezember 1971 im Krankenhaus vorstellig, nachdem sie zuvor bereits bei zahlreichen Ärzten in Behandlung war. Zu dieser Zeit konnte sie einen Schatten mit wurmartigen Bewegungen wahrnehmen, wenn sie ins Licht sah. Bei der Untersuchung wurden ein kleiner, weißer, beweglicher Wurm neben der Makula und unregelmäßige Linien auf der Retina festgestellt. Die Larve wurde mittels Laser photokoaguliert und so abgetötet. Einen Monat nach der Behandlung wurden weder ein toxischer Effekt des toten Wurms, noch eine intraokuläre Entzündung festgestellt. Es besteht der Verdacht, dass sich die Mesozerkarie bereits seit mehreren Jahren im Auge der Frau befand, bevor sie diagnostiziert wurde. Der Autor vermutet eine direkte Infektion über Froschschenkeln, die zum Verzehr im eigenen Haushalt der Patientin regelmäßig zubereitet wurden. Auch bei gefangenen Fröschen aus der Umgebung und untersuchten Fröschen aus der Gefriertruhe der Frau, konnten *Alaria* sp. Mesozerkarien nachgewiesen werden (SHEA et al. 1973).

Im Mai 1969 wurde ein 17jähriger Junge aus San Francisco, Kalifornien, mit einer einseitigen Gesichtsfeldeinschränkung vorstellig. Es wurde eine lebende Larve gefunden, die jedoch nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Nach der Gabe von Anthelminthika starb die Larve innerhalb weniger Tage ab und löste eine Uveitis im betroffenen Auge aus. Die Entzündung wurde mit Kortison behandelt (BYERS und KIMURA 1974).

Verschiedene Autoren berichten auch bei Tieren von Infektionen des Auges mit Mesozerkarien von *Alaria* spp.. PEARSON (1956) wies Mesozerkarien im Auge eines Frosches nach. Mehrere Autoren zeigten bei Versuchen, dass die Mesozerkarien von *Alaria* spp. in der Lage sind, die Augen von Säugetieren zu penetrieren. WALTERS et al. (1975) zeigten bei Versuchen mit Kaninchen, dass die Mesozerkarien von *Alaria* spp. die Kornea eines Säugetieres durchdringen können

und auch nach Injektion ins Auge dort längere Zeit überleben. Die entzündlichen Reaktionen im Auge waren relativ mild. Bei längerer Überlebenszeit des Parasiten kam es zu chronischen, heftigeren, lokalen Reaktionen mit zahlreichen eosinophilen Zellen (WALTERS et al. 1975). LESTER und FREEMAN (1975) führten Versuche mit Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen durch. Nach 24 Stunden fand er noch 10 % und nach einer Woche noch 1 % der zuvor penetrierten Zerkarien. Die längste Überlebenszeit im Auge einer Ratte betrug 18 Tage. Die meisten Zerkarien drangen nur bis zur Bowman'schen Membran vor. Wenige, die bis ins Stroma eindrangen, verschwanden zu 90 % innerhalb von drei Tagen wieder. Die Autoren gehen davon aus, dass sie zurück auf die Kornea wanderten und dort vom Augenlid weggewischt wurden. Auf dem infizierten Auge zeigten sich direkt nach der Penetration weißliche Auflagerungen (LESTER und FREEMAN 1975). Aufgrund weiterer Untersuchungen geht der Autor davon aus, dass die Stärke der Kornea einen limitierenden Faktor hinsichtlich der Invasionsfähigkeit des Parasiten darstellt, die Linse zu erreichen. Er geht davon aus, dass die Zerkarien bei badenden Menschen in freien Gewässern keine Möglichkeit haben, das Innere des Auges zu erreichen. Lediglich oberflächliche pathologische Veränderungen der Augen können durch den Parasiten verursacht werden (LESTER und FREEMAN 1976).

1976 wurde erstmals eine generalisierte Infektion eines Menschen beschrieben (FERNANDES et al. 1976; FREEMAN et al. 1976). Betroffen war ein 24-jähriger Kanadier, der mit Fieber, Schmerzen im Abdomen, Husten mit blutigem Auswurf, subkutanem Emphysem und Kurzatmigkeit ins Krankenhaus eingeliefert wurde. Ein Röntgenbild der Lunge zeigte diffuse knotige Veränderungen. Im Rahmen einer Lungenbiopsie wurden mehrere hämorrhagische Herde und eine einzelne Mesozerkarie gefunden. Daraufhin wurde der Patient mit Breitspektrumantibiotikum, Anthelminthika und Steroiden behandelt. Trotz der Therapie entwickelte der Mann eine disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC). Ab dem vierten Tag des Krankenhausaufenthalts musste der Patient künstlich beatmet werden, am fünften Tag wurde er für Hirntot erklärt. Bei der Autopsie wurden hämorrhagische Ergüsse im Thorax und im Abdomen gefunden. Die mikroskopischen Untersuchungen ergaben sieben verschiedene pathologische Reaktionen: in allen Organen konnten Blutungen gefunden werden, v. a. in Lunge, Gastrointestinaltrakt und Gehirn. Außerdem wurden Thromben und lokale Nekrosen gefunden. Entzündliche Veränderungen in Form von Granulomen zeigten sich in Leber, Lymphknoten und Magenwand. Im Perikarderguss und im Bronchialsekret wurden lebende Larven gefunden, aber auch in vielen anderen Organen, v. a. in den Sinus und im Fettgewebe der Lymphknoten. In der Leber wurden die Larven im Bereich der Leberpforte und im Parenchym nachgewiesen. Zusätzlich konnten Mesozerkarien in der Magenwand, dem Myokard, in Pankreas, im retroperitonealen Fettgewebe, in Milz, Nieren, Lunge, Gehirn und im Rückenmark gefunden werden. In keinem der Fälle wurde eine entzündliche Reaktion um den Parasiten herum gefunden, auch wenn die Gänge der Parasiten nachverfolgt wurden. Zusätzlich wurde im Bereich der Haut, der Nieren und der Leber eine Vaskulitis nachgewiesen. Es wurde während der gesam-

ten Zeit keine Eosinophilie festgestellt, was für eine Infektion mit Helminthen kennzeichnend wäre (LÖSCHER und SONNENBURG 2005). Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass eine generalisierte anaphylaktische Reaktion durch die wiederholte orale Aufnahme von infiziertem Material ausgelöst werden kann. Die Symptome eines anaphylaktischen Schocks reichen von Tachykardie und Blutdruckabfall bis zu vasomotorischen Kollaps und Bewusstlosigkeit (BORK 1999; EGGER 2005). CURTSINGER und SHOOP (1986) zeigten jedoch anhand eines Mäusemodells, dass bei einer Infektion mit *Alaria* spp. erst nach etwa 10 Tagen mit einem Anstieg der eosinophilen Leukozyten zu rechnen ist. Das erklärt das initiale Fehlen einer Eosinophilie bei beschriebenen Humaninfektionen (FERNANDES et al. 1976; FREEMAN et al. 1976). Die Infektionsquelle des Mannes konnte nicht eindeutig geklärt werden, es wird jedoch eine Ansteckung über unzureichend erhitzte Froschschenkel vermutet. Da ein Frosch mit tausenden Mesozerkarien befallen sein kann, lässt sich auch die Infektion des Patienten mit mehreren tausend Larven erklären. Die Autoren gehen davon aus, dass die Larven sich sowohl direkt durchs Gewebe, als auch durch die lymphatischen Bahnen im Körper verteilt haben, da sie besonders häufig im retroperitonealen Fett und in den Lymphknoten nachgewiesen wurden. Als Todesursache wurde eine generalisierte immunologische Reaktion mit daraus folgenden Lungen - und Hirnblutungen festgestellt.

1.2.6 Tenazität

Verschiedene Autoren haben sich mit der Tenazität der Mesozerkarien gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen beschäftigt. Dabei zeichnete sich der Parasit durch eine hohe Widerstandskraft gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen aus. Bei 8 °C überlebten die Mesozerkarien in Ringerlösung drei Monate (WALTERS et al. 1975). DUNCKER (1896) wies eine Überlebenszeit bei Kühlschranktemperaturen, bei der die Mesozerkarien ihre Bewegungen jedoch einstellten (ab 8 °C keine Bewegung mehr), von drei bis vier Tagen, BUGGE (1942a) sogar von 16 bis 18 Tagen nach. Die Egel konnten dabei jederzeit durch Erwärmung wieder zu lebhaften Bewegungen angeregt werden. Sogar die abwechselnde Abkühlung und Erwärmung auf Zimmertemperatur überlebten sie über einen Monat lang (FREEMAN et al. 1976). Einfrierversuche bei -20 °C überlebten die Parasiten bis zu acht Wochen (HASSLINGER und NAGLER 1969; HIEPE 1985). Bei Versuchen zur Brauchbarmachung von Fleisch stellte VALLÉE et al. (2006) nach fünf Tagen bei -18 °C noch lebende Mesozerkarien fest. Nach RAU und GORDON (1978) überleben die Mesozerkarien von *Alaria* spp. den kanadischen Winter (bis ca. -15°C) in poikilothermen Wirten wie der Strumpfbandnatter (*Thamnophis sirtalis sirtalis*). Die Mesozerkarie von *Alaria* spp. scheint damit gegenüber unterschiedlichen Temperaturen sehr widerstandsfähig.

Bei Versuchen zum Temperaturverhalten wies SHOOP (1985) nach, dass die Larven immer entlang eines positiven Temperaturgradienten wandern und ab 25 °C verstärkte Motilität zeigen. Dabei können sie bis zu 2,5 cm in fünf Minuten zurücklegen. Bei Kontrollversuchen wurden Reaktionen durch andere Umweltreize (Geo-, Photo- oder Lösungsunterschiede) ausgeschlossen.

Bereits MCCUE und THORSON (1964) und THORSON et al. (1964) zeigten, dass alle Helminthen entlang eines Temperaturgradienten zur wärmeren Seite hin wandern. Dieses Verhalten ist so stark ausgeprägt, dass die Parasiten bis in Temperaturbereiche wandern, bei denen sie absterben. Die Autoren gehen davon aus, dass es sich um eine fehlgeleitete thermotaktische Reaktion handelt, bei der die Larven eine „Leerlaufreaktion“ zeigen. Es ist davon auszugehen, dass die Larven nicht zu einem negativen Feedback in der Lage sind, und so dem Stimulus folgen, auch wenn er zum Tod führt. *In vitro* dem positiven Temperaturgradienten zu folgen entspricht genau dem Gegenteil dessen, was die Larven *in vivo* bei natürlich infizierten Säugern zeigen, wo sie vom Magen mit höherer Kerntemperatur zum Unterhautfettgewebe mit niedrigerer Außentemperatur wandern (SHOOP 1985).

Im Rahmen der Brauchbarmachung von Fleisch wurde bei Pökerversuchen festgestellt, dass die Mesozerkarien im Schweinefleisch den Vorgang des Pökels bis zu 10 Tage überleben können (HASSLINGER und NAGLER 1969; HIEPE 1985).

FREEMAN et al. (1976) isolierte bei der Infektion eines Kanadiers mit Mesozerkarien von *A. americana* Parasiten und führte einige *in vitro* Versuche durch. Der Einsatz von Antiparasitika (Bithional oder Niridazol) zeigte, dass bereits minimale Konzentrationen (im Verhältnis zu therapeutisch wirksamen Gewebekonzentrationen der Wirkstoffe) den Egel innerhalb von 20 Minuten immobilisieren und töten. Höchste Konzentrationen von Emetin-HCL, Chloroquin-PO₄ und Antimon-Tartarate waren dagegen wirkungslos und die Egel lebten noch zwei Tage nach dem Experiment.

Bei *in vitro* Versuchen mit Mesozerkarien von *A. arisaemoides*, *A. marciana* und *A. mustelae* wurde die Entwicklung und das Überleben der Mesozerkarien in verschiedenen Medien (standardisiertes NCTC 135 - Medium und Triple Eagle Medium je einzeln oder in Kombination mit Hühner-, Hunde-, Pferde-, Kalb-, fetalem Kalb- oder Menschenserum, mit Hühnereidotter oder mit Kückenembryoextrakt (CEE)) untersucht. Es zeigte sich, dass sich keine der Mesozerkarien in keinem der Medien zur Metazerkarie weiterentwickelte. Die Überlebenszeit von *A. marciana* war mit bis zu 27 Tagen in einem Medium aus NCTC 135 gemischt mit Kälberserum am höchsten. In den anderen Medien überlebten deutlich weniger Egel über die gleiche Zeit (JOHNSON et al. 1985). Angaben zur Bebrütungstemperatur fehlen.

Zur Überlebenszeit der Mesozerkarien von *Alaria* spp. im Wirt wurden bis jetzt keine Versuche durchgeführt. Bei den Mesozerkarien von *Pharyngostomoides*, einer Trematode, die nah mit *Alaria* spp. verwandt ist und die den gleichen Lebenszyklus hat, beschrieb MILLER (1981) eine Überlebenszeit der Mesozerkarien in einem Wirtstier (Waschbär) von bis zu 11 Jahren. In weiteren Versuchen einige Jahre später zeigte er, dass die Mesozerkarien von *Pharyngostomoides procyonis* in einem weiblichen Waschbär sogar knapp 14 Jahre überlebten und in dieser Zeit 25 Nachkommen über die Milch infizierten (MILLER 1984).

Zur Tenazität der Mesozerkarien gegenüber Trockenheit wurde bis jetzt nur eine Untersuchung durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Egel 50 bis 60 Stunden Austrocknung nicht überstanden,

sie waren danach in den Kompressorien vollkommen reaktionslos (HASSLINGER und NAGLER 1969).

1.2.7 Geographische Verbreitung – Prävalenz

Die Saugwürmer der Gattung *Alaria* sind weltweit verbreitet. In Europa und Asien kommt nach bisherigem Kenntnisstand nur eine Art vor, *Alaria alata*. In Nordamerika sind dagegen mehrere Spezies bekannt.

Das Vorkommen der frühen Entwicklungsstadien von *A. alata* in Amphibien wurde vor allem in Osteuropa untersucht. In Weißrussland wurden in 1,28 % der Spitzschlammschnecken (*Lymnaea stagnalis*) und in 1,7 % der Gemeinen Tellerschnecken (*Planorbis planorbis*) *Alaria alata* Furkozerkarien nachgewiesen (NIKITINA 1986). Der Frosch als Zweiter obligater Zwischenwirt wurde auch in Deutschland untersucht. Verschiedene Froscharten aus den Gebieten Brandenburg und Sachsen-Anhalt wiesen einen Befall von 14,8 % mit Mesozerkarien von *A. alata* auf (ANDREAS 2006). In Weißrussland wurden bei verschiedenen Krötenarten sogar Prävalenzen von knapp 70 % nachgewiesen (SHIMALOV und SHIMALOV 2001b).

Säugetiere sind häufiger Gegenstand von genauen parasitologischen Untersuchungen. MEHLHORN (2008) geht davon aus, dass über 30% der Wildcaniden in Europa Träger von *A. alata* sind. Weltweit betrachtet ist *Alaria* spp. mit einer mittleren Prävalenz von 3 bis 5 % die häufigste Trematode in Nearktischen (Nordamerika bis Nord-Mexiko sowie Grönland) und Paläarktischen (Europa, Nordafrika bis zum Südrand der Sahara und Asien) Wolfpopulationen (*Canis lupus*). *A. alata* zeigt mit durchschnittlich 5,1 % dabei in den Regionen der mittleren Breiten die höchste Prävalenz (CRAIG und CRAIG 2005). Die Spanne der Prävalenz ist beim Wolf von 2 % (Spanien, (SEGOVIA et al. 2003)) bis 89 % (Estland, (MOKS et al. 2006)) relativ groß. BAGRADE et al. (2009) geht davon aus, dass die Hauptinfektionsquelle für Wölfe infizierte Wildschweine darstellen. Frösche und infizierte Kleinnager sind ebenfalls mögliche Überträger der Infektion.

Auch der Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) ist ein häufiger Endwirt in Europa. Die Prävalenz liegt zwischen 0,54 % in Süddeutschland (SCHOTT und MÜLLER 1989) und 55,3 % in Weißrussland (SHIMALOV und SHIMALOV 2003). Bei zahlreichen Untersuchungen zum Befall des Rotfuchses mit Helminthen, stellten die Autoren fest, dass die Prävalenz von *Alaria* spp. mit den geoklimatischen Verhältnissen der Regionen korreliert. So konnte in wasserreichen Gebieten, in denen die benötigten ersten und zweiten Zwischenwirte (Schnecken, Frösche) vorhanden waren, immer eine höhere Prävalenz an *Alaria* spp. nachgewiesen werden als in wasserarmen Gegenden (LOOSFRANK und ZEHYLE 1982; LUCIUS et al. 1988; STEINBACH et al. 1994; MANKE und STOYE 1998; RAMISZ und BALICKA-RAMISZ 2001; SEGOVIA et al. 2002; BALICKA-RAMISZ et al. 2003; EIRA et al. 2006). Einen signifikant niedrigeren Befall von Füchsen mit dem Parasiten während der Fortpflanzungszeit (Januar bis Juni) im Gegensatz zu den restliche Monaten des Jahres (Juli bis Dezember) wiesen WOLFE et al. (2001) nach. Die Autoren gehen davon aus, dass der höhere

Befall in den Wintermonaten mit der vermehrten Aufnahme von befallenen Fröschen im Spätsommer zusammenhängt.

Ebenfalls häufig infiziert ist der Marderhund (*Nyctereutes procyonoides*), der in Osteuropa und seit 1960 auch in Ostdeutschland verbreitet ist. Mit einer Prävalenz über 70 % und einer Befallsintensität von 1 bis 16.200 Parasiten ist *A. alata* beim Marderhund in Ostdeutschland die am häufigsten nachgewiesene Trematode (THIESS et al. 2001; THIESS 2004). In Osteuropa liegt der Befall zwischen 23,52 % im Wolgadelta (IVANOV und SEMENOVA. 2000) und 50,8 % in Polesien (Weißrussland) (SHIMALOV und SHIMALOV 2002b). Andere mögliche wildlebende Endwirte in Europa sind z.B. der Eurasische Luchs (*Lynx lynx*, 6 %), der Amerikanische Nerz (*Mustela vison*, 12,5 % bis 21,42 %), der Fischotter (*Lutra lutra*, 2,6 %) und der Goldschakal (*Canis aureus*, 20 %) (PAPADOPOULOS et al. 1997; IVANOV und SEMENOVA 2000; GORSKI et al. 2006; SZCZESNA et al. 2008). Bei der Untersuchung von Steinmardern (*Martes foina*) aus Schleswig–Holstein konnte *Alaria* spp. nicht nachgewiesen werden, obwohl die benötigten Zwischenwirte vorhanden sind und in Nordamerika relativ hohe Prävalenzen bei Steinmardern bekannt sind (PFEIFFER et al. 1989).

In Europa sind unter den domestizierten Tieren Hunde (*Canis familiaris*) und Katzen (*Felis silvestris catus*) als Endwirte bekannt, wobei streunende Tiere in der Regel stärker befallen sind (PAUNOVIC 1994). Bei den Hunden variiert die Befallsstärke je nach Region zwischen 0,43 % in Südschweden (JOGELAND et al. 2002) und 16,67 % in Belgrad (KULISIC et al. 1998). Streunende Katzen wurden nur in Moskau untersucht und wiesen eine Prävalenz von 1,1 % auf (IASTREB et al. 2005).

Die Verbreitung des Parasiten in der Umwelt erfolgt nicht nur über den Endwirt, sondern auch über die paratenischen Wirte. So ist ein paratenischer Wirt, über den die Infektion auch den Menschen erreichen kann, z.B. das Schwein. Bei Hausschweinen (*Sus scrofa domestica*) kam es bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts zu Funden der Mesozerkarie von *A. alata* (DUNCKER 1884; DUNCKER 1896; DUNCKER 1897). Nach weiteren vereinzelt Funden während des 20. Jahrhunderts (BUGGE 1942a; BUGGE 1942b; AGERTH 1915; BAARS 1942) kam es in den letzten Jahren vermehrt zu Nachweisen im Wildschwein (*Sus scrofa*) in Deutschland, Frankreich und Osteuropa. 2007 wurden im Land Brandenburg bei der Untersuchung von Sammelproben von insgesamt 25.618 Wildschweinen im Rahmen der Trichinellenuntersuchung in 62 Fällen Duncker'scher Muskelegel nachgewiesen. Weitere Funde wurden auch aus den Ländern Sachsen–Anhalt, Sachsen und aus Mecklenburg–Vorpommern gemeldet (GROÙE und WÜSTE 2008).

Auch in Kroatien kam es bereits 2001 bei der regulären Trichinellenuntersuchung mittels Kompressionsverfahren von 210 Wildschweinen bei drei Wildschweinen zu Funden der Mesozerkarie des Saugwurms *A. alata* (JAKŠIC et al. 2002). Im Rahmen einer Trichinellenuntersuchung von Wildschweinfleisch in Frankreich im Jahr 2003 wurden *A. alata* Larven im Muskelfleisch von zwei Wildschweinen aus dem Osten Frankreichs gefunden. In den Jahren 2006 und 2007 wurden er-

neut bei 16 Trichinellenuntersuchungen von über 525 Wildschweinen aus der gleichen Region Larven gefunden (VALLÉE et al. 2006). Die direkte Übertragung von Mesozerkarien zwischen paratenischen Wirten ist durchaus normal (ODENING 1963; HIEPE 1985). Daher sind hohe Befallsraten besonders in Omnivoren wie dem Wildschwein, die in Gebieten mit hohen Prävalenzen an *Alaria* im Endwirt leben, häufig. Das liegt daran, dass diese Tiere außer den obligaten, zweiten Zwischenwirten (Frösche) auch die paratenischen Wirte wie Nager, Reptilien und andere Amphibien fressen (DÖNGES 1969). Im Allgemeinen kann auch in paratenischen Wirten, wie schon weiter oben für die Endwirte beschrieben, eine signifikant erhöhte Prävalenz der Mesozerkarien von *A. alata* in wasserreichen Gebieten erwartet werden (BUGGE 1942b; WOJCIK et al. 2001). WOJCIK et al. (2001) führten hierzu von 1999 bis 2001 in zwei Jagdgebieten Untersuchungen durch. Die larvale Alariose wurde nur in einer der zwei untersuchten Regionen nachgewiesen. In dieser Region zeigten die Ergebnisse der parasitologischen Studien infizierte paratenische Wirte (*Sus scrofa*), Endwirte (*Canis familiaris*) und Zwischenwirte (*Planorbis planorbis*, *Anisus vortex*, *Rana temporaria*, *Rana terrestris*) wohingegen in der anderen Region die Zwischenwirte aufgrund der Umweltbedingungen (keine wasserreichen Gebiete) fehlten und somit auch bei den anderen Wirten keine Infektionen nachgewiesen wurden (WOJCIK et al. 2001).

Weitere paratenische Wirte aus der Klasse der Säugetiere, bei denen Larven nachgewiesen wurden, sind Maulwürfe (*Talpa europaea*; SHIMALOV und SHIMALOV 2001b), Otter (*Lutra lutra*; SHIMALOV und SHIMALOV 2000b), Hermeline (*Mustela erminea*), Mauswiesel (*Mustela nivalis*; SHIMALOV und SHIMALOV 2001c), Nerze (*Neovison vison*; SHIMALOV et al. 2001a), Iltisse (*Mustela putorius*; SHIMALOV und SHIMALOV 2002a) und Mäuse (*Apodemus agrarius*, *A. sylvaticus*; SHIMALOV 2002c; GOÛY DE BELLOCQ et al. 2003). Es wurden jedoch bis auf die Mäuse nur Tiere aus Weißrussland untersucht und die maximale Prävalenz lag mit 12 % beim Maulwurf am höchsten. In Polen konnten bei Eidechsen (*Zootoca vivipara*; LEWIN 1992) und in Weißrussland bei verschiedenen Schlangenarten (*Natrix natrix*, *Coronella austriaca*, *Vipera berus*; SHIMALOV und SHIMALOV 2000b), Molchen (*Triturus vulgaris*, *T. cristatus*; SHIMALOV und SHIMALOV 2001d) und Eidechsen (*Lacerta agilis*, *L. vivipara*; SHIMALOV et al. 2000a) Mesozerkarien nachgewiesen werden.

CASTRO et al. (2009) geben für Südamerika an, dass dort *A. alata* vorkommt, wohingegen für Nordamerika mehrere andere Spezies, jedoch nicht *A. alata* beschrieben sind. In Uruguay wurde *A. alata* bei einer von vier untersuchten Hauskatzen (*Felis silvestris catus*, 25 %) nachgewiesen (CASTRO et al. 2009). MARTINEZ et al. (2000) untersuchte verschiedene wild lebende Carnivoren aus Argentinien und fand *Alaria alata* bei 17,64 % der Tiere. Aus Brasilien gibt es Berichte von infizierten Pampasfüchsen (*Pseudalopex gymnocercus*) und Maikongs (*Cerdocyon thous*) mit einer Prävalenz von bis zu 50 % (RUAS et al. 2008). Eine weitere *Alaria* - Spezies, *A. marciannae*, wurde bei einem Berglöwen (*Puma concolor*) in Paraguay gefunden (FISCHTHAL und MARTIN 1977).

In Nordamerika wurden bei Fröschen (*Rana catesbeiana*, *R. pipiens*) Mesozerkarien von *Alaria* spp. in Arizona und in Nord- und Süd-Dakota mit einer Prävalenz zwischen 4 und 55 % nachgewiesen (GOLDBERG et al. 1998; GOLDBERG et al. 2001).

Die Prävalenz des Parasiten bei untersuchten Hunden (*Canis lupus familiaris*) in den USA und Kanada lag zwischen 7 und 10 % (ALLEN und MILLS 1971; UNRUH et al. 1973). Bei einer Katze (*Felis silvestris catus*) aus New Jersey konnte *A. marciana* gefunden werden (BURROWS und LILLIS 1965). Die Prävalenz weiterer Endwirte in Nordamerika lag zwischen 1,2 % bei Fischermardern (*Martes pennanti*; DICK und LEONARD 1979) und 100 % bei Florida-Panthern (*Puma concolor*; FOSTER et al. 2006).

Als paratenische Wirte wurden in Nordamerika ein befallener Flusssotter (*Lontra canadensis*) aus Ontario und Westliche Schwarznacken-Strumpfbandnattern (*Thamnophis cyrtopsis cyrtopsis*) aus Arizona mit einer Prävalenz von 4 % nachgewiesen (PEARSON 1956; GOLDBERG und BURSEY 2002).

Auch aus dem Iran ist der Befall eines Goldschakals (*Canis aureus*) mit *A. canis* bekannt (DALIMI et al. 2006).

1.2.8 Nachweisverfahren

Der Nachweis des adulten Parasiten erfolgt durch die Untersuchung von Kot auf Eier mit Hilfe des Sedimentationsverfahrens (PAPAZAHARIADOU et al. 2007; POPIOLEK et al. 2007; SZCZESNA et al. 2008; BRIDGER und WHITNEY 2009; BAGRADE et al. 2009). Im Gegensatz dazu ist ein standardisiertes Verfahren zum sicheren und praktikablen Nachweis des mesozerkarialen Stadiums in Fleisch bisher nicht bekannt. Manche Autoren beschreiben, dass sie die Larven bereits makroskopisch oder mit einer Lupe nachweisen konnten (BOSMA 1931; BUGGE 1943; ODENING 1960; ODENING 1963; HIEPE 1985; ODENING 1961a). Mit der Lupe sollen die Entwicklungsstadien des Parasiten als glasklare, dünnwandige Zysten zu sehen sein, in denen die beweglichen Larven zu erkennen sind (ODENING 1961a; BOSMA 1931; BUGGE 1943; HIEPE 1985). BAARS (1942) konnte in Paraffinblock – Schnittpräparaten von befallener Muskulatur eines Wildschweins große, bindegewebig abgegrenzte Hohlräume mit im Inneren liegenden Mesozerkarien von *Alaria alata* nachweisen. Duncker nutzte als erster die für die Trichinellenuntersuchung eingesetzte Kompressionsmethode zum Nachweis der Mesozerkarien (DUNCKER 1881a), woraufhin auch andere Autoren sie zur Untersuchung ihrer Proben einsetzten (BAARS 1942; BUGGE 1942a, b; BUGGE 1943; HASSLINGER und NAGLER 1969; WITTRÖCK und ULMER 1974). Nach Einführung der VO (EG) Nr. 2075/2005 ist der Einsatz der Kompressionsmethode seit dem 01.01.2010 in den EU Mitgliedsstaaten nicht mehr gestattet. In den europäischen Nicht-Mitgliedsstaaten wird diese Methode hingegen zum Teil weiterhin angewendet und in diesem Zusammenhang auch für die Diagnostik von *A. alata* genutzt. So wurden in Kroatien in einer Studie drei von 210 untersuch-

ten Wildschweinen mittels Kompressionsmethode positiv für *Alaria alata* Mesozerkarien getestet (JAKŠIĆ et al. 2002).

Alternativ ist der Nachweis der Mesozerkarien im Blut der paratenischen Wirte möglich. IASTREB et al. (2005) entwickelten eine Methode zur Untersuchung von Blutproben lebender Tiere auf Mesozerkarien. Dazu entnahmen sie den Tieren venöses Blut, das sie im Verhältnis 1:20 mit Natriumcitrat 5 % versahen. 1 ml des Blutes gaben sie in ein 10 ml – Zentrifugenröhrchen und füllten es mit 9 ml destilliertem Wasser auf. Das ganze ließen sie für fünf Minuten stehen, so dass die Erythrozyten hämolysierten. Danach wurde es fünf Minuten bei 2000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein Sediment von 0,5 ml abgeschüttet. Das Sediment wurde dann auf einen Objektträger gebracht, mit einem Deckgläschen bedeckt und unter dem Mikroskop bei zehnfacher Vergrößerung untersucht. Er wies mit dieser Methode sowohl freie als auch enzystierte Mesozerkarien nach.

1.2.8.1 Die Trichinellenuntersuchung nach Verordnung (EG) Nr. 2075/2005

Die Trichinellen wurden erstmals von dem britischen Zoologen Richard Owen (1804 – 1892) beschrieben. Erst 1860 gelang es Friedrich Albert von Zenker (1825 – 1898), einen Fall von tödlich verlaufender Trichinose beim Menschen auch als solche zu erkennen. Zu dieser Zeit brachen häufig regionale Epidemien aus, so dass die Medizinische Gesellschaft zu Berlin eine Kommission zur Beratung der Trichinellenfrage einsetzte. Ihr gehörte unter anderem Rudolf Virchow an, der in seiner Schrift „Darstellung der Lehre von den Trichinen, mit Rücksicht auf die dadurch gebotenen Vorsichtsmaßregeln“ (G. Reimer, Berlin 1864) nachdrücklich die Einführung einer amtlichen Fleischschau in allen Städten forderte. Die Trichinellenuntersuchung wurde 1862 in der sächsischen Stadt Plauen, 1877 in Preußen, und 1900 mit Einführung des Reichsfleischbeschaugesetzes für das ganze Deutsche Reich gesetzlich vorgeschrieben (MAPPEs 2001). 1940 wurde die Trichinellenuntersuchung für verschiedene Tierarten im Fleischbeschaugesetz geregelt. Die Untersuchung erfolgte mittels Kompressionsmethode und Mikroskop. Erst 1978 wurde eine vereinfachte Methode durch künstliche Verdauung von Sammelproben eingeführt (SIELAFF 1962; ENIGK 1986). Beim sogenannten Magnetrührverfahren, das seit 2005 in der Europäischen Union als Referenznachweismethode für die Trichinellenuntersuchung von der Europäischen Gemeinschaft festgelegt wurde, werden Frischfleischproben aus Zwerchfell, Zunge oder Vorderbein der zu untersuchenden Schweine oder Wildschweine (VO (EG) Nr. 2075/2005, Anh. I, Kap. I, Nr. 2) in einem Ansatz mit Pepsin und Salzsäure und einem Magnetrührer künstlich verdaut und sedimentiert. Das Sediment wird dann mit dem Mikroskop auf Trichinellen untersucht (VO (EG) Nr. 2075/2005, Anh. I, Kap. I, Nr. 3).

In Anlehnung an das Protokoll für die amtliche Trichinellenuntersuchung (TU), beschrieben in Anhang I, Kapitel I der Verordnung (EG) Nr. 2075/2005, wurden von MÖHL et. al (2009) verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Das Protokoll wurde sowohl unverändert als auch in Modifikation

getestet, um die Effektivität der TU zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels zu optimieren. Die Modifikation orientierte sich an der in der Literatur beschriebenen Affinität des Parasiten für Fettgewebe (MÖHL et al. 2009). Es wurde eine Methode entwickelt, bei der Fettgewebe in einem Magnetrührer mit Pankreatin® und Gallensäure verdaut wurde. Obwohl nur 10 – 15 % des Probenmaterials tatsächlich verdaut wurden, war die Anzahl der gefundenen Larven deutlich höher als bei Vergleichsproben, die parallel mit der TU untersucht wurden. Beobachtungen unter dem Stereomikroskop zeigten, dass sich die Parasiten aktiv vom Probenmaterial in die umgebende Flüssigkeit bewegten und dort eine sehr starke Motilität aufwiesen. Larven im Sediment der TU zeigten dagegen deutlich weniger bis keine Aktivität mehr oder waren bereits abgestorben. Isolierte, lebende Larven, die in eine HCL/Pepsin – Verdauungslösung gegeben wurden verloren bereits nach 15 Minuten ihr charakteristisches Bewegungsmuster und ihre morphologischen Strukturen. Nach 90 Minuten begannen die Mesozerkarien sich aufzulösen. Zu beachten ist, dass das Experiment nach Einsetzen der Mesozerkarien in die Verdauungslösung ohne Zuhilfenahme eines thermisierten Magnetrührers weitergeführt wurde. Es ist daher zu erwarten, dass unter Praxisbedingungen der Verlust von Larven durch Schädigung noch schneller und deutlicher auftritt. Gemäß der Angabe der VO (EG) Nr. 2075/2005 Anh. I, Kap. I, Nr.1 muss zur Untersuchung ein Sieb mit einer Maschenweite von 180 µm verwendet werden. Dies stellt einen weiteren Nachteil der TU dar. So wurden immer wieder lebende Larven von während der TU genutzten Sieben isoliert (RIEHN et al. 2010).

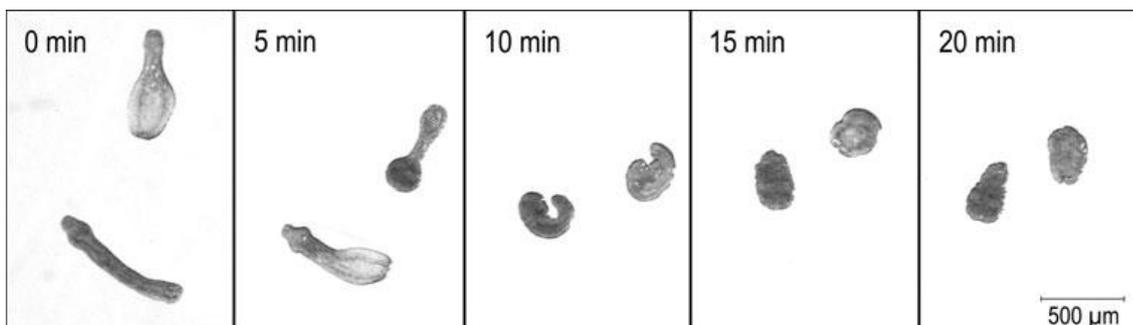


Abbildung 2: *Alaria alata* Mesozerkarien in 5 ml HCL/Pepsin – Verdauungsflüssigkeit aus einem Sammelansatz zur Untersuchung von Fleischproben auf *Trichinella* spp. nach Anhang I, Kapitel I der VO (EG) Nr. 2075/2005. Die Mesozerkarien waren nach Einsetzen in die Verdauungslösung keiner Wärmequelle und keinem Magnetrührer ausgesetzt (RIEHN et al. 2010).

1.2.8.2 Das Larvenauswanderverfahren nach Baermann

BAERMANN (1917) entwickelte Anfang des 20. Jahrhunderts ein Verfahren, um Erdproben auf Nematodenlarven zu untersuchen. Seine Überlegungen gingen von der Tatsache aus, dass die

infektiösen Nematodenlarven aus dem Kot in überstehendes Wasser auswandern. Die Materialien für die Untersuchung bestanden aus einem Glastrichter, der fast bis zum Rand mit sterilem, filtriertem Wasser gefüllt wurde. In den Glastrichter setzte er ein engmaschiges Sieb. In das Sieb füllte er zuvor sterilisierte Erde, die er mit Stuhl vermischte. Am unteren Ende des Trichters befestigte er einen kurzen Gummischlauch, den er mit einer Schlauchklemme verschloss. Nach einer gewissen Auswanderungszeit ließ er einige Tropfen des Sediments auf einen Objektträger ab und fand dort zahlreiche Larven. Er führte eine Reihe von Versuchen mit unterschiedlichen Variationen der von ihm entwickelten Methode durch. Seine Ergebnisse zeigten, dass die Larven rasch in das offene Wasser auswanderten und lockere Erde mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 cm in zwei Minuten durchwandern konnten. Im Wasser selbst sanken die Larven mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 cm pro Sekunde. Er stellte fest, dass nach der ersten halben Stunde der größte Teil der Larven bereits ausgewandert war und dass seine Methode so genau arbeitet, dass er sieben von acht ausgestreuten Larven wiederfand (BAERMANN 1917).

BEANE und HOBBS (1983) verglichen Anfang der 80iger Jahre verschiedene Modifikationen des Baermann-Verfahrens. Sie stellten fest, dass sie mehr Larven bei einer Auswanderungszeit von 24 Stunden als bei acht Stunden nachweisen konnten. Auch fanden sie bei zerkleinertem Kot mehr Parasiten als in intaktem. Die Untersuchung der Proben mit kleinen Trichtern (6,3 cm) funktionierte besser als mit großen (15 cm) und Glastrichter eigneten sich besser als Plastiktrichter (BEANE und HOBBS 1983).

CORT et al. (1922) zeigten, dass Hakenwurmlarven schneller aus Erdproben auswandern, wenn das Wasser mindestens ~ 5,5 °C (10 °F) wärmer ist als die Erdprobe. Außerdem stellten sie fest, dass in größeren Erdproben mehr Larven zu finden sind als in sehr fein zerkleinerten. Die Ergebnisse bewiesen auch, dass zwar nach sechs Stunden die meisten Larven ausgewandert sind, nach dieser Zeit aber nochmals eine beträchtliche Menge an Parasiten zu finden ist.

TODD et al. (1970) stellten fest, dass mehr Larven von *Haemonchus contortus* auswanderten, wenn sie Mulltuch-Filter anstelle von Filtern aus Zellstoff verwendeten. Sie wiesen mehr Larven bei 4°, 10°, 20° und bei 25 °C als bei 30° - 50 °C nach. Keinen Unterschied machte die Verwendung von Leitungswasser, 0,9%ige NaCl-Lösung, Ringerlösung und 0,2 %iger HCl. Ungünstig stellten sich nicht-ionische und zwei-anionische Detergentien dar, welche ab einer gewissen Konzentration sogar toxisch wirkten. Kein signifikanter Unterschied zeigte sich bei der Untersuchung im Dunkeln oder im Hellen. Die Autoren konnten jedoch nachweisen, dass bei einem größeren Durchmesser des Trichters weniger Larven gefunden werden können als bei einem kleinen Durchmesser.

1.2.9 Verbraucherschutz

Bereits 1963 stellte ODENING (1963) die Überlegung an, ob die Einführung einer spezifischen Untersuchung zum Nachweis von *Alaria alata* Mesozerkarien nicht anzuraten wäre. Er empfahl

dabei die Untersuchung von fett- und bindegewebereichen Proben von Rippenmuskulatur, Schultergürtel und Hals der zu untersuchenden Schweine. Er sprach außerdem die Empfehlung aus, betroffenes Fleisch nicht mehr zum menschlichen Verzehr frei zu geben und dem Parasiten bei der Fleischuntersuchung mehr Aufmerksamkeit zu widmen (ODENING 1961a). Durch eine steigende Anzahl von Funden des Parasiten vor allem in Brandenburg wurde die Diskussion um die mögliche Gefährdung der Verbraucher in den letzten Jahren neu aufgebracht (GROßE und WÜSTE 2004; GROßE und WÜSTE 2005; GROßE und WÜSTE 2006; GROßE und WÜSTE 2008). Das Bundesinstitut für Risikobewertung hat 2007 eine Stellungnahme zu diesem Thema veröffentlicht (siehe auch 2.10.2 *Beurteilung der Situation durch das BfR*).

1.2.9.1 Wildverzehr und Froschverzehr in Deutschland und Europa

Deutschland ist in Europa das Land mit der größten Schwarzwildpopulation (STEINBACH 2010). Nach Angaben des Deutschen Jagdschutz Verbandes (DJV) wurden in der Jagdsaison 2010/2011 in Deutschland 25.058 Tonnen Wildbret vom Schalenwild (Wildschwein, Rehwild, Rotwild, Damwild) verzehrt. Mit 13.472 Tonnen lag der Verzehr von Wildschweinen am höchsten (DJV 2012). In Deutschland werden nach Angaben des Statistischen Bundesamtes außerdem im Jahr etwa 11 Tonnen Froschschenkel verzehrt. Einer der Hauptexporteure von Froschschenkeln weltweit ist Indonesien, das auch einen Großteil der deutschen Nachfrage deckt. Die Mehrheit der exportierten Frösche stammt dabei aus Wildfängen. Im Jahr 2002 wurden 3.800 Tonnen exportiert. Mit mehr als 83 % der indonesischen Exporte ist Europa der größte Abnehmer der Froschschenkel. Nur wenige Arten sind durch internationale Vereinbarungen wie das Washingtoner Artenschutzabkommen CITES geschützt (WWF 2006). In Deutschland sind alle heimischen Arten nach der Bundesartenschutzverordnung und dem Bundesnaturschutzgesetz „besonders geschützt“ oder „streng geschützt“. Auch die für den Lebensmittelhandel bedeutenden außereuropäischen Arten wie der Nordamerikanische Ochsenfrosch oder der Asiatische Ochsenfrosch sind nach dem Bundesnaturschutzgesetz „besonders geschützt“. Das bedeutet, dass die Tiere nicht gezüchtet, gefangen, verletzt oder getötet werden dürfen. Allerdings ist dadurch nur Deutschland abgedeckt und die Einfuhr ist davon nicht betroffen. Nur der Handel von Tieren, die im Washingtoner Artenschutzabkommen erfasst sind, wird international kontrolliert (WISIA 2010). Die Hauptimporteure für Froschschenkel in Europa sind Frankreich, Belgien und Luxemburg. Hauptexporteure und damit Lieferanten für Europa ist neben Indonesien vor allem China. Die Europäische Union importierte 1990 über 6.000 Tonnen Froschschenkel und 1999 waren es bereits über 9.700 Tonnen. Das vormals saisonale Geschäft hat sich zu einem ganzjährigen globalen Handel entwickelt. Am häufigsten werden der „crab-eating“ Frosch (*Fejervarya cancrivora*), der Zahnfrosch (*Limnonectes macrodon*) und der Amerikanische Ochsenfrosch (*Rana catesbeiana*) importiert (WARKENTIN et al. 2009). Untersuchungen der Purdue University zufolge sind 56,6 % der auf dem Markt erhältlichen Froschschenkel mit Mesozerkarien von *Alaria* spp. in einer Befallsstärke von bis zu einigen Tausend Parasiten infiziert (JAKŠIĆ et al. 2002).

1.2.9.2 Beurteilung der Situation durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

Nach Einschätzung des Bundesinstituts für Risikobewertung stellt befallenes Wildschweinfleisch ein potentielles Infektionsrisiko für den Menschen dar (BfR 2007). Im Hinblick auf die Fleischuntersuchung bei frei lebendem Wild (Kapitel 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. Für den Fall des Nachweises des Duncker'schen Muskellegels im Fleisch sollte daher laut BfR aus Gründen des vorbeugenden Verbraucherschutzes das Fleisch als untauglich für den menschlichen Verzehr beurteilt werden. Weiterhin spricht das BfR eine Empfehlung zur Entwicklung eines geeigneten diagnostischen Verfahrens zum Nachweis des Duncker'schen Muskelegels aus, um zur weiteren (regionalen) Aufklärung des Vorkommens und zu seiner Bedeutung in Deutschland beizutragen. Es wird weiterhin angeführt, dass das Schweizer Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL) *Alaria alata* in die Sicherheitsstufe 2 (Z) eingruppiert hat und der Parasit damit zu den Zoonosen gehört (BAFU 2011).

2 Materialien und Methoden

2.1 Optimierung des neu entwickelten Verfahrens

2.1.1 Testung verschiedener Medien

2.1.1.1 Material

Geräte und Reagenzien:

Siehe Punkt 2.2.11 *Die Alaria alata mesocercariae migration technique (AMT)*.

Außerdem:

- Isotonische Natriumchlorid - Lösung (DeltaSelect GmbH, Dreieich, Germany)
- Ringer – Lösung (DeltaSelect GmbH, Dreieich, Germany)
- Ringer – Lactat – Lösung (BERLIN-CHEMIE AG, Berlin, Germany)
- Glukose - Lösung 5 % (DeltaSelect GmbH, Dreieich, Germany)
- Leitungswasser

Probennahme und zu verarbeitende Mengen:

Es wurden insgesamt 3 kg positives Material von vier Wildschweinen aus Sachsen und Brandenburg genutzt, die auf Grund von Funden des Duncker'schen Muskelegels von den zuständigen Untersuchungsämtern als untauglich beurteilt worden waren (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über die Wildschweine, aus denen *Alaria* spp. Mesozerkarien für die Testung der Medien gewonnen wurden

Nr.	Tier-Nr.	Vorbericht	Herkunft	Todesursache	Altersklasse	Gewicht	Geschlecht
1	55	positiv	Brandenburg	erlegt	1	54	männlich
2	59	positiv	Görlitz	erlegt	0	18	weiblich
3	69	positiv	Bernburg Ilsenburg	erlegt	k. A.	k. A.	k. A.
4	71	positiv	Bernburg Ilsenburg	erlegt	0	9	weiblich

2.1.1.2 Verfahren

Versuchsaufbau und Untersuchungsverfahren siehe Punkt 2.2.11 *Standard operating procedure (SOP) der Alaria alata mesocercariae migration technique*.

- Je ein Trichter wurde mit Leitungswasser, Ringerlösung, Ringer-Laktat-Lösung, NaCl – Lösung und 5 %iger Glukoselösung aufgefüllt.

Die Ergebnisse wurden im dafür vorgesehenen Protokoll und im Probenbuch notiert.

Der Versuch wurde insgesamt 20 x durchgeführt.

2.1.2 Testung verschiedener Zerkleinerungsgrade

2.1.2.1 Material

Geräte und Reagenzien:

Geräte und Reagenzien siehe Punkt 2.2.11 *Die Alaria alata mesocercariae migration technique (AMT)*.

2.1.2.2 Probennahme und zu verarbeitende Mengen:

Es wurden insgesamt 2,4 kg positives Material von sechs Wildschweinen aus Sachsen, Sachsen - Anhalt und Brandenburg genutzt, die auf Grund von Funden des Duncker'schen Muskelegels von den zuständigen Untersuchungsämtern als untauglich beurteilt worden waren (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht über die Wildschweine, aus denen *Alaria* spp. Mesozerkarien für die Testung der Zerkleinerungsgrade gewonnen wurden

Nr.	Tier-Nr	Vorbericht	Herkunft	Todesursache	Altersklasse	Gewicht	Geschlecht
1	69	positiv	Bernburg Ilseburg	erlegt	k. A.	k. A.	k. A.
2	70	positiv	Bernburg Ilseburg	erlegt	k. A.	k. A.	k. A.
3	73	positiv	Salzlandkreis	erlegt	0	8	k. A.
4	110	positiv	Salzlandkreis	erlegt	1	49	Weiblich
5	113	positiv	Salzlandkreis	erlegt	k. A.	k. A.	k. A.
6	114	positiv	Salzlandkreis	erlegt	k. A.	k. A.	k. A.

Verfahren

Versuchsaufbau siehe Punkt 2.2.11 *Standard operating procedure (SOP) der Alaria alata mesocercariae migration technique*.

- Von 120 g Gewebe wurde ein ca. 30 g schweres Stück abgeschnitten. Der Rest wurde mit dem Messer und dem Schneidebrett grob zerkleinert (2 – 2,5 cm) und vermengt.
- 30 g wurden weiter mit dem Messer auf 1 – 1,5 cm und weitere 30 g auf 2 – 5 mm zerkleinert.
- Die vier Proben mit den verschiedenen Zerkleinerungsgraden (ungeschnitten; 2 – 2,5 cm; 1 – 1,5 cm; 2 – 5 mm Kantenlänge) wurden je in ein Sieb gegeben und die Trichter mit 46 – 48 °C warmem Leitungswasser befüllt.

Die weitere Untersuchung erfolgte wie unter Punkt 2.2.11 *Standard operating procedure (SOP) der Alaria alata mesocercariae migration technique* beschrieben.

2.1.3 Testung verschiedener Auswanderungszeiten

2.1.3.1 Material

Geräte und Reagenzien:

Geräte und Reagenzien siehe Punkt 2.2.11 *Die Alaria alata mesocercariae migration technique (AMT)*.

2.1.3.2 Probennahme und zu verarbeitende Mengen:

Es wurde insgesamt 450 g positives Material von zwei Wildschweinen aus Sachsen genutzt, die auf Grund von Funden des Duncker'schen Muskelegels vom zuständigen Untersuchungsamt als untauglich beurteilt worden waren. Zusätzlich wurde 150 g positives Probenmaterial von einem auf der Insel Rügen verunfallten Dachs verwendet, der dem Institut für Lebensmittelhygiene zur Untersuchung vom Amt Brandenburg überlassen wurde (Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht über die Tiere, aus denen *Alaria* spp. Mesozerkarien für Testung der Zeiten gewonnen wurden

Nr.	Tier-Nr.	Vorbericht	Herkunft	Todesursache	Altersklasse	Gewicht	Geschlecht
1	6 (Dachs)	positiv	Insel Rügen	überfahren	k. A.	5	k. A.
2	69 Wildschwein	positiv	Bernburg Ilseburg	erlegt	k. A.	k. A.	k. A.
3	70 Wildschwein	positiv	Bernburg Ilseburg	erlegt	k. A.	k. A.	k. A.

2.1.3.3 Verfahren

Versuchsaufbau siehe Punkt 2.2.11 *Standard operating procedure (SOP) der Alaria alata mesocercariae migration technique*.

- Es wurde nach 30 Minuten, 60 Minuten, 90 Minuten und 240 Minuten 20 ml Sediment in das darunter stehende Becherglas abgelassen und jeweils sofort untersucht. Nach jedem Ablassen wurde der Trichter erneut mit warmem Leitungswasser aufgefüllt, damit das Probenmaterial weiterhin vollständig mit Wasser bedeckt war.

Die weitere Untersuchung erfolgte wie unter Punkt 2.2.11 *Standard operating procedure (SOP) der Alaria alata mesocercariae migration technique* beschrieben.

2.2 Ringversuch

2.2.1 Weiterführung eines Ringversuches für die Optimierung der Untersuchungsmethode

Erste vergleichende Analysen im Rahmen des vorhergehenden Forschungsvorhabens 2808HS012 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.

Drüber hinaus ist eine Bewertung der Relevanz des Erregers für die Gesundheit des Menschen unter Einbeziehung valider Daten zu Prävalenz und Verteilung des Parasiten nur durch den flächendeckenden Einsatz der AMT zu gewährleisten.

Der Einsatz der AMT innerhalb der Routinediagnostik setzt jedoch eine 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.

2.2.2 Auswahl geeigneter Laboratorien und Kontaktaufnahme

Bis zum heutigen Tag haben sich 28 Laboratorien am Ringversuch für den Nachweis des Duncker'schen Muskelegels in Fleisch mittels AMT teilgenommen. Die Teilnehmer waren aus 9 Bundesländern (Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Brandenburg, Berlin, Niedersachsen, Schleswig-Holstein, Baden-Württemberg, Bayern) sowie ein Labor aus Österreich, die in der Vergangenheit bereits erste Erfahrungen bei der Diagnostik des Duncker'schen Muskelegels sammeln konnten, ausgewählt und schriftlich über diese Auswahl informiert. Den Ringversuchsteilnehmern wurde der Versand der Proben etwa 2 Wochen im Voraus angekündigt.

Die für die Auswertung erforderlichen Labordaten wurden im Institut für Lebensmittelhygiene (IfL) erfasst und die Laboratorien anschließend codiert. Die Codierung der Laboratorien und die Zuweisung einer spezifischen Labornummer erfolgten dabei nach dem Zufallsprinzip.

2.2.3 Auswahl des am besten geeigneten Materials und einer geeigneten Methode zur Herstellung der Standardmaterialien.

Die Akquise natürlich infizierter Zwischenwirte wurde durch die enge Kooperation mit verschiedenen Veterinärämtern in Sachsen, Sachsen-Anhalt und Brandenburg realisiert. Insgesamt wurden dem Institut für Lebensmittelhygiene im bisherigen Projektzeitraum 234 Wildschweine durch kooperierende Veterinärämter oder die entsprechenden Verfügungsberechtigten übergeben.

Für die Durchführung der Ringversuche konnten im bisherigen Projektzeitraum ausschließlich die hochpositiven Wildschweine und Waschbären genutzt werden, da für einen 10 Laboratorien umfassenden Ringversuch mindestens 300 vitale DME plus weitere 90 DME für die Führung von Rückstellproben benötigt werden. DME aus Tieren, die schwächere Befallsraten aufwiesen, wurden indes für die Realisierung anderer Projektziele (Tenazität, Molekularbiologie) eingesetzt.

Für die Auswahl des am besten geeigneten Materials für die Herstellung der Standardmaterialien sowie deren Herstellung wurden umfangreiche Versuche mit frischem Hausschwein- und Wildschweinfleisch vorgenommen. Ziel dieser Versuche war es, Standardmaterialien herzustellen, welche zum einen das Überleben und die Wiederauffindbarkeit der DME über längere Zeiträume und unter Transportbedingungen gewährleisten und zum anderen möglichst realitätsnahe Bedingungen bei der Probenaufbereitung im Rahmen des Ringversuchs bieten. Neben der Auswahl der eigentlichen Probenmatrix standen aus diesem Grund auch die Art und der Grad der Zerkleinerung des Probenmaterials (unzerkleinert, grob oder feinerkleinert), das Einbringen der Larven in das Probenmaterial (einzeln an verschiedenen Stellen des Probenmaterials oder zusammen an einem Punkt), die Auswahl etwaiger protektiv auf die Larven wirkender Zusatzstoffe und Hilfsmittel (z. B. Gelatinekapseln) sowie die Führung des Temperaturregimes bei der Lagerung im Fokus der Untersuchungen. Insgesamt wurden in diesem Zusammenhang 234 Einzelversuche vorgenommen.

Der erste Teil des Ringversuches wurde mit vorherichtlich negativem Wildschweinfleisch durchgeführt. Da jedoch alle Tiere, die dem Institut für Lebensmittelhygiene zur Verfügung gestellt werden von Tieren aus potentiellen Infektionsgebieten stammen, kann ein, wenn auch geringer, Befall dieser Tiere mit dem Erreger nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Gleichzeitig haben die Tenazitätsversuche im eigenen Haus, wie auch die anderer internationaler Forschungsgruppen gezeigt, dass eine Gefrierbehandlung die Erreger nicht sicher abtötet. Der Zukauf von Wildschweinfleisch aus anderen Gebieten, in denen der Erreger bislang nicht auftritt, ist indes nur unter Aufbringung unverhältnismäßig hoher Kosten zu realisieren. Aus Praktikabilitäts- und Kostengründen wurde daher, nach eingehender Prüfung der Überlebensfähigkeit der Mesozerkarien, im zweiten Ringversuchsteil auf Hausschweinfleisch (Rücken) zurückgegriffen. Es deutet sich jedoch an, dass bei der Verwendung von Hausschweinfleisch an erhöhten Anfall von Detritus zu beobachten ist, welcher die Untersuchung der Proben erschweren kann. Beim dritten Ringversuchsteil wurde das negative Wildschweinfleisch verwendet.

2.2.4 Möglichkeiten der Beschaffung einer ausreichenden Anzahl natürlich infizierter paratenischer Wirte zur Herstellung des Probenmaterials.

Die Akquise natürlich infizierter Zwischenwirte wurde durch die enge Kooperation mit verschiedenen Veterinärämtern in Sachsen, Sachsen-Anhalt und Brandenburg realisiert. Insgesamt wurden dem Institut für Lebensmittelhygiene im bisherigen Projektzeitraum 234 Wildschweine übergeben.

2.2.5 Erstellung von Unterlagen für die Datenerfassung

Die Unterlagen für die Datenerfassung wurden in elektronischer Form erstellt.

2.2.6 Erstellung eines Zeitplans

Der Zeitplan wurde in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der Wildschweine erstellt.

2.2.7 Isolierung von vitalen *Alaria alata* Mesozerkarien aus natürlich infizierten paratenischen Wirten

Alle vorberichtlich DME-positiven Wildschweine wurden in den kooperierenden Veterinärämtern bis zur Abholung durch das IfL und der sich anschließenden Probennahme bei max. 4°C gelagert. Nach der Enthäutung und Zerlegung der Tiere erfolgte die Probennahme an verschiedenen anatomisch definierten Lokalisationen. Das entnommene Probenmaterial wurde im Anschluss in beschriftete, verschließbare Plastikbeutel verbracht und die Mesozerkarien mittels der AMT isoliert.

Die untersuchten Wildschweine wiesen unterschiedliche Befallsintensitäten auf. Diese reichten von 1 bis 82 Larven/100 g. Gewebe. Bei der sich anschließenden lichtmikroskopischen Untersuchung wurde die Vitalität der Larven anhand ihrer Motilität beurteilt. Hier zeigten alle Mesozerkarien durchweg eine gute bis sehr gute Vitalität.

2.2.8 Probenvorbereitung

Die Herstellung der Standardmaterialien erfolgte durch Verbringen der vitalen DME in 30 g grob zerkleinertes, negatives Wildschwein- bzw. Hausfleisch. Hierzu wurde eine zuvor genau abgezählte Anzahl Larven mittels einer Pipette auf die Hälfte des vorbereiteten Wildschwein- bzw. Hausfleischs gebracht und mit dem restlichen Material abgedeckt. Für den Ringversuch wurden pro Teilnehmer insgesamt 6 Proben vorbereitet. Bei diesen Proben handelte es sich um 4 DME-positive und 2 DME-negative Proben.

2.2.9 Homogenitätstest

Zur Sicherung der Qualität des Standardmaterials wurden Proben aus allen Chargen nach einer 24stündigen Lagerung bei 4°C im Institut für Lebensmittelhygiene gemäß den Anweisungen der SOP untersucht. Die Larvenwiederfindungsrate lag hier bei 100%.

2.2.10 Kennzeichnung, Zwischenlagerung und Versand der Proben

Jede Probe wurde in einen Plastikbecher verpackt und der oben stehenden Tabelle entsprechend nummeriert. Alle Proben wurden bis zum Versand im Kühlraum bei 4°C gelagert. Alle Laboratorien erhielten je einen Satz Proben, eine standardisierte Versuchsapparatur bestehend aus Glastrichter, Sieb, Schlauch und Schlauchklemmen, einen Vordruck zur Datenerfassung sowie eine Standard Operation Procedure (SOP) für den Nachweis des Duncker'schen Muskelegels in Fleisch mittels AMT (s. Anhang 5.1).

Der Versand der Proben erfolgte mittels Kurier. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass alle Proben binnen 20 h bei den Empfängern eingingen.

2.2.11 Die *Alaria alata mesocercariae migration technique* (AMT)

Die Proben waren mit der Standard Operating Procedure (SOP) für den Nachweis des Duncker'schen Muskelegels mittels *Alaria alata mesocercariae migration technique* (AMT) zu untersuchen. Die Ergebnisse wurden auf einem vorbereiteten Formblatt an das Institut für Lebensmittelhygiene (IfL) zurückgesendet.

Aufbau und Untersuchungsverfahren wurde im *Standard operating procedure (SOP) der Alaria alata mesocercariae migration technique* beschrieben.

1. Materialien

- Messer oder Schere und Pinzette zur Probenentnahme
- Schneidebrett
- Stativ, Ringe und Klammern
- Glastrichter, Durchmesser 10 cm
- Sieb, Kunststoff, Durchmesser 9 cm
- Gummischlauch, ~ 10 cm lang, Durchmesser 10 mm
- Quetschhähne nach Mohr, 60 mm
- Becherglas, 50 ml Inhalt
- Trichinoskop mit Horizontaltisch oder Stereomikroskop mit in der Intensität einstellbarer Durchlichtquelle
- Petrischalen mit 9 cm Durchmesser (für die Verwendung mit dem Stereomikroskop), deren Boden mit einem spitzen Gegenstand in Quadrate von 10 x 10 mm eingeteilt sind
- Larvenzählbecken (für die Verwendung mit dem Trichinoskop), aus 3 mm starken Acrylplatten
- Lauwarmes Leitungswasser, 40 – 43 °C
- Waage, mindestens auf 0,1 g genau

2. Verfahren

- Die Glastrichter werden im Stativ fixiert, der Gummischlauch wird am Trichter fixiert und mit einer Schlauchklemme verschlossen.

- Unter die Schläuche wird je ein Becherglas zum Ablassen des Sediments gestellt.
- In jeden Trichter wird ein Sieb eingesetzt (Abbildung 3).
- Die Gewebeproben werden mit dem Messer und dem Schneidebrett grob zerkleinert ($\varnothing \sim 1$ cm).
- Die Proben werden aus den relevanten Stellen (Zwerchfell, Kehlkopf, Zunge, Kaumuskulatur, Zwischenrippenmuskulatur, Bäckchen, Bauchfell) entnommen.
- Je 30 g des Untersuchungsmaterials werden in ein Sieb gegeben.
- Der Trichter wird dann mit etwa 100 -150 ml lauwarmem Leitungswasser aufgefüllt.
- Wichtig: Das Probenmaterial muss vollständig mit Wasser bedeckt sein.
- Der Probenansatz bleibt für 45 Minuten bei Raumtemperatur stehen.
- Nach dieser Zeit werden 15-20 ml Flüssigkeit schnell in einen Messzylinder abgelassen und in ein Larvenzählbecken/eine Petrischale überführt.
- Dann wird der Messzylinder mit höchstens warmem 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 parasiten-ähnlichen Formen ist die Vergrößerung auf 60- bis 100fach zu erhöhen.
- Der Duncker'sche Muskelegel ist in der Regel an seiner Bewegung eindeutig zu erkennen.



Abbildung 3: Darstellung des Versuchsaufbaus zur Durchführung der *Alaria alata* mesocercariae migration technique (AMT)

2.3 Prävalenz und Prädilektionsstellen

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

2.3.1 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, 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.

2.3.2 Probennahme

Das Probenmaterial wird an 7 anatomisch definierten Probennahmestellen entnommen; die Probennahmestellen umfassten Zwerchfellpfeiler, Zunge, Kaumuskulatur (*Mm. masseter, temporalis, pterygoideus* lat.), Backe (Gewebe der caudoventralen Kopfregion mit Anteilen von Muskulatur, Fett-, Binde-, Lymph- und Drüsengewebe), Zwischenrippenmuskulatur, Bauchmuskulatur (*Mm. rectusabdominis, obliquus externus et internus abdominis, transversus abdominis*) und Kehlkopf.

2.3.3 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.

2.4 Tenazität

In den bislang von uns durchgeführten Studien hinsichtlich der Tenazität des Duncker'schen Muskellegels zeigte sich, dass es deutliche Unterschiede hinsichtlich der Überlebensfähigkeit einzelner *Alaria-alata*-Isolate gibt, wenn diese physikalischen und chemischen Belastungen ausgesetzt wurden.

Im Rahmen des aktuellen Forschungsprojektes wurden Versuchsreihen zur Bestimmung der Tenazität von Mesozerkarien im Hinblick auf unterschiedliche NaCl-Konzentrationen in einem *in-Vitro*-Versuch durchgeführt (Arbeitsschritt 1). Weiterhin sollte die Überlebensfähigkeit von *Alaria alata* unter dem Einfluss verschiedener Desinfektionsmittel (Arbeitsschritt 2), sowie in Ringerlösung und künstlich hergestelltem Magensaft (Arbeitsschritt 3) überprüft werden. Zusätzlich sollte die Tenazität von *Alaria alata* in verschiedenen Fleischprodukten, u.a. in Rohwürsten und Schinken getestet werden (Arbeitsschritt 4).

Ziel dieses Arbeitsschrittes war es, auf Grundlage der Untersuchungsergebnisse und den neugewonnenen Erkenntnissen eine Empfehlungen zur effektiven Abtötung der Parasiten in verschiedenen Lebensmitteln zu geben. Gleichzeitig sollten die Ergebnisse eine bessere Abschätzung des humanen alimentären Expositionsrisikos ermöglichen.

2012 wurden Proben von Wildschweinen und Waschbären in Brandenburg, Berlin, Sachsen und Sachsen-Anhalt gesammelt, bei denen in insgesamt 26 Fällen *Alaria alata* nachgewiesen werden konnten (18 Wildschweine, 8 Waschbären). Der Nachweis erfolgte im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung auf Trichinellen. Positive Proben wurden für die weitere Untersuchung innerhalb von 5 Tagen an das Institut für Lebensmittelhygiene der Universität Leipzig versendet. Aus diesem Grunde wurden Proben von Wildschwein und Waschbären nur in unregelmäßigem Abstand an unser Labor geliefert.

Das infizierte Fleisch dieser Tiere wurde als Modell verwendet, um die Tenazität gegenüber verschiedenen Behandlungsverfahren zu überprüfen. Waschbären werden in Deutschland nicht als Lebensmittel verwendet, eigneten sich jedoch als sehr gutes Modeltier für die durchgeführten Experimente.

2.4.1 Fleischprodukte

2.4.1.1 Trockenpökeln von Schinken aus Wildschwein- und Waschbärenfleisch

Es wurden zwei verschiedene Herstellungsverfahren angewendet. Das Trockenpökeln des Wildschweinschinkens (n= 15) und Waschbärenschinkens (n= 4) erfolgte nach einer traditionellen Rezepturen (Abbildung 4). Die Schinken waren zwischen 200 bis 350 g schwer. Für jedes Produkt wurden zwei Experimente durchgeführt.

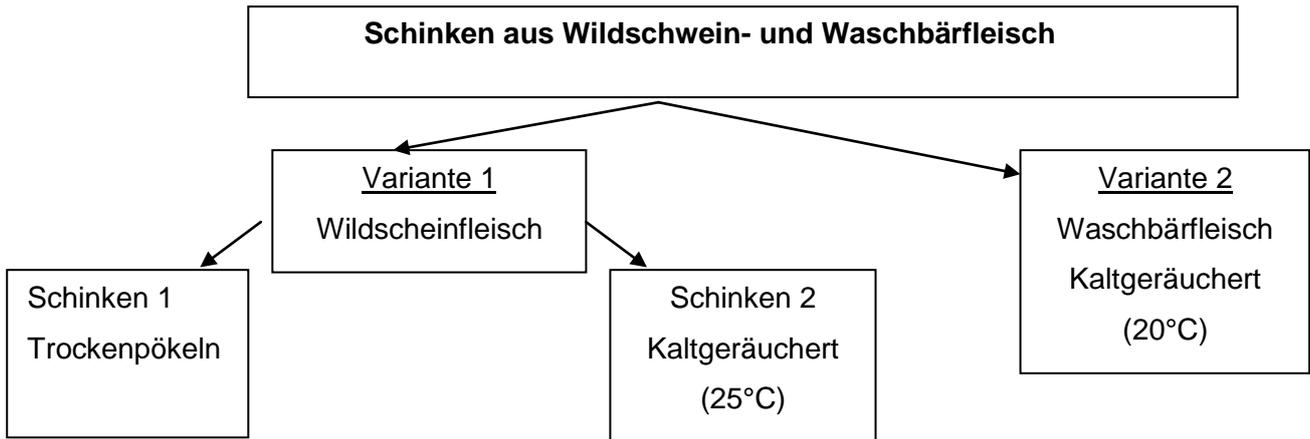


Abbildung 4: Herstellungsverfahren und Varianten der Trockenpökeln von Rohschinken aus Wildschwein- und Waschbärenfleisch

2.4.1.1.1 Variante 1

Die Herstellung der Schinken erfolgte unter der Einhaltung gültiger Hygienevorschriften für die Lebensmittelproduktion im Schlacht- und Zerlegebereich des Instituts für Lebensmittelhygiene. Das Schinkenfleisch wurde aus der Keule (*Mm. biceps femoris, semimembranosus* und *longissimus dorsi*) entnommen.

Für die Trockenpökelnung wurde das Fleisch in 10cm² kleine Stücke geschnitten. Mit Hilfe einer Bohrhülse wurde in jedes Fleischstücke ein Zylinder von 1cm³ gestanzt. 20 vitale *A. mesocercariae* wurden in das Fleisch dotiert. Um Larvenverluste zu vermeiden wurde das Loch anschließend wieder mit dem zuvor ausgestanzten Fleischstück verschlossen. Das Fleisch wurde mit 40g Nitritpökelsalz (NPS) gesalzen und damit eine Konzentration von 2-3 % erreicht. Das Versuchsmaterial wurde in einem Kunststoffeimer für insgesamt 13 Tage bei Raumtemperatur gelagert. Um eine gleichmäßige Verteilung des Salzes zu erreichen, wurden die Proben einen Tag nach der Behandlung bei Raumtemperatur (18-20 ° C) gelagert. Das überschüssige Salz wurde von der Schinkenoberfläche mit Trinkwasser abgespült. Anschließend wurden die gesalzenen Schinken von Oberflächenschimmel befreit und getrocknet.

Sowohl der Wildschwein- als auch der Waschbärenschinken wurden bei maximal 25 °C für 24 Stunden und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 bis 85 % geräuchert. Diese Proben werden im Folgenden als Schinken 1 bezeichnet. Produkte die einer Kalträucherung (20°C für 48 Stunden) unterzogen wurden, werden im Folgenden als Schinken 2 bezeichnet.

Alle Probe wurde im Reiferaum bei 26 °C gelagert. Die Proben wurden nach 5 Tagen kontrolliert. Die Untersuchung der Schinken erfolgte über 16 (Schinken 1) bzw. 17 (Schinken 2) Tage. Die Schinken wurden täglich gewogen und der pH-Wert gemessen. Anschließend wurde die Probe mittels der AMT-Methode auf *A. alata mesocercariae* untersucht.

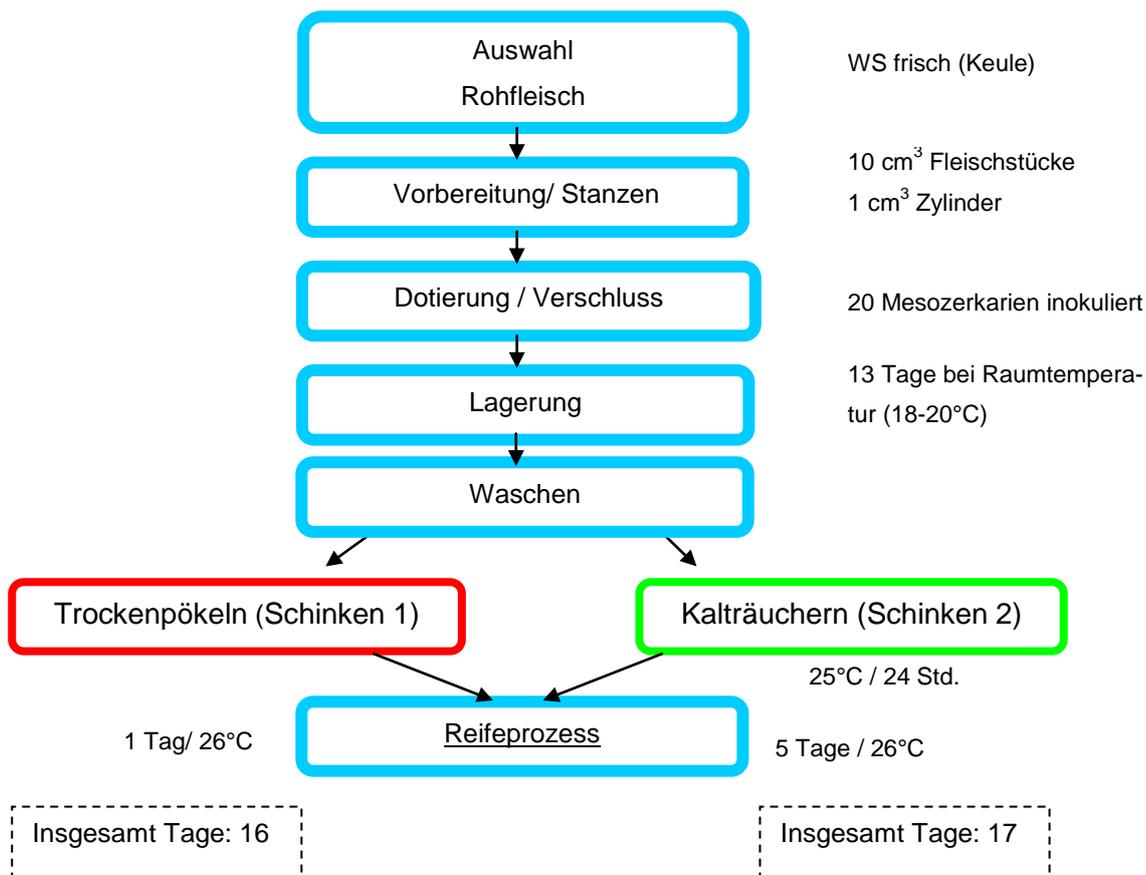


Abbildung 5: Verfahren zur Trockenpökellung und Kalträucherung von Wildschweinschinken

2.4.1.1.2 Variante 2

In einer zweiten Variante wurde frische Oberschenkelmuskulatur aus nachweislich infizierten Waschbären entnommen, mit NPS (2-3% Salzkonzentration) gesalzen und bei Raumtemperatur (18-20 °C) gelagert. Anschließend wurden die Proben für weitere 5 Tage bei einer relativen Luftfeuchtigkeit (RH) von 90% gelagert. Die Proben wurden danach mit Leitungswasser gewaschen und 12 Stunden gewässert. Im Anschluss wurde das Fleisch für 2 Tage kalt geräuchert. Mit Hilfe von Holz wurde Kaltrauch in einer Räucherammer bei 20 °C (RH: 80-85 %) zugeführt. Alle Schinken wurden anschließend in einem Klimaraum bei einer Temperatur von 20-22 °C für 3 Tage aufgehängt (Abbildung 6). Der pH-Wert der Proben wurde täglich gemessen und die Proben mittels AMT-Methode auf *A. mesocercariae* untersucht. Insgesamt dauerte die Produktion 12 Tage.

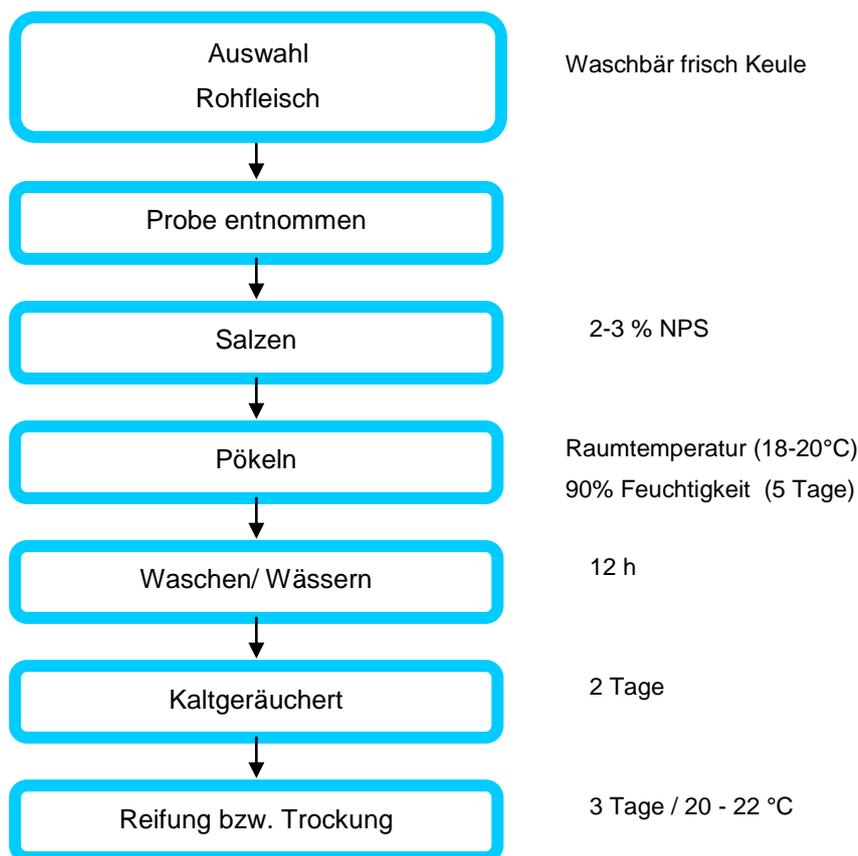


Abbildung 6: Flussdiagramm mit Verfahrensschritten zur Trockenpökellung von Waschbärenschinken

2.4.1.2 Salami aus Wildschein- und Waschbärenfleisch

Die Salami-Würste wurden in zwei unterschiedlichen Varianten hergestellt. Pro Variante wurden jeweils 2 kg fettfreies Wildschweinfleisch verwendet. Dieses Magerfleisch wurde zerkleinert und per Hand (10 min) mit Fettgewebe vermengt. Zusätzlich wurden 56 g NPS (28 g/kg) und 0,41g (1,03 g/kg) einer handelsüblichen Starter-Kulturmischung, bestehend aus 0,5 g *Lactobacillus sakei* und 0,5 g *Staphylococcus carnosus* beigefügt. Die Homogenisierung und Vermischung aller Bestandteile erfolgte in einem Fleischwolf (Kenwood Fleischwolf 1500 w, 4 mm Feinheitsgrad). Anschließend wurde das bearbeitete Fleisch zusätzlich per Hand für 5 min vermengt. Das Brät wurde mit einer manuellen Füllmaschine in 40mm kalibrige Kunstdärme (Naturin, Viscofan, Weinheim, Deutschland) gefüllt. Variante 1 (n = 19) wurde mit 20 *Alaria*-Larven, die zuvor mittels AMT-Methode isoliert wurden, beimpft. Zusätzlich wurde kleine Würfel hochinfiziertes Waschbärenfleisch beigefügt.

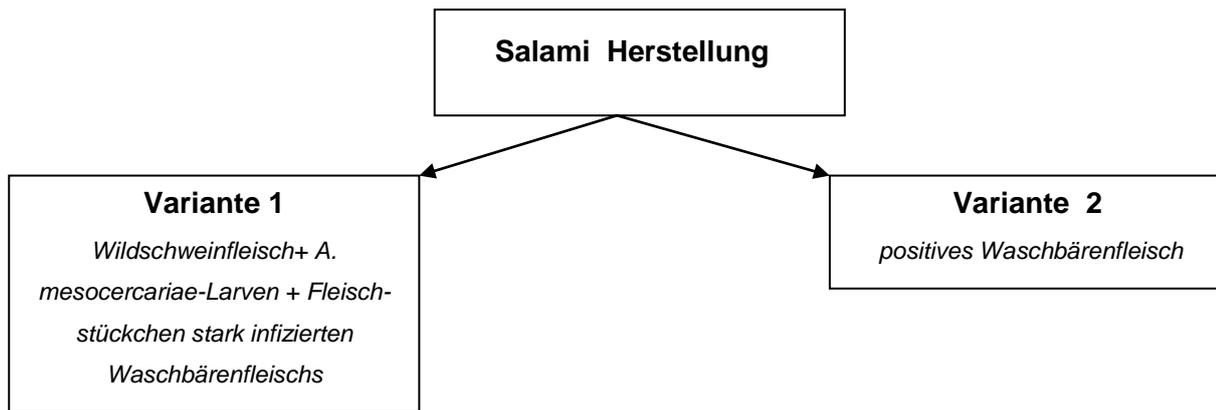


Abbildung 7: Herstellungsvarianten und verwendete Ausgangsmaterialien bei der Herstellung von Salami-Würsten

Variante 2 (n=23) wurde ausschließlich aus infiziertem Waschbärenfleisch hergestellt. Die Vorbereitung erfolgte in gleicher Weise wie bei Variante 1: 0,52 kg Magerfleisch, sowie Fettgewebe von positivem Waschbärenfleisch wurde zerkleinert und mit 14,5 g NPS (28 g/kg) und 2,5 g Zucker vermenget. Die Salamis wurden im Reiferaum bei 23-25 °C und 88–90 % RH für 24 Stunden (Abbildung 7) gelagert. Die vorgereiften Würste wurden im Anschluss bei 18 - 19°C und 75-80 % RH für weitere 10 Tage gereift. Die Salamis wurden bis zum Ende des Reifeprozesses täglich untersucht. Der pH-Wert wurde gemessen und pro Tag eine Wurst mittels AMT-Technik auf *Mesozerkarien* untersucht.

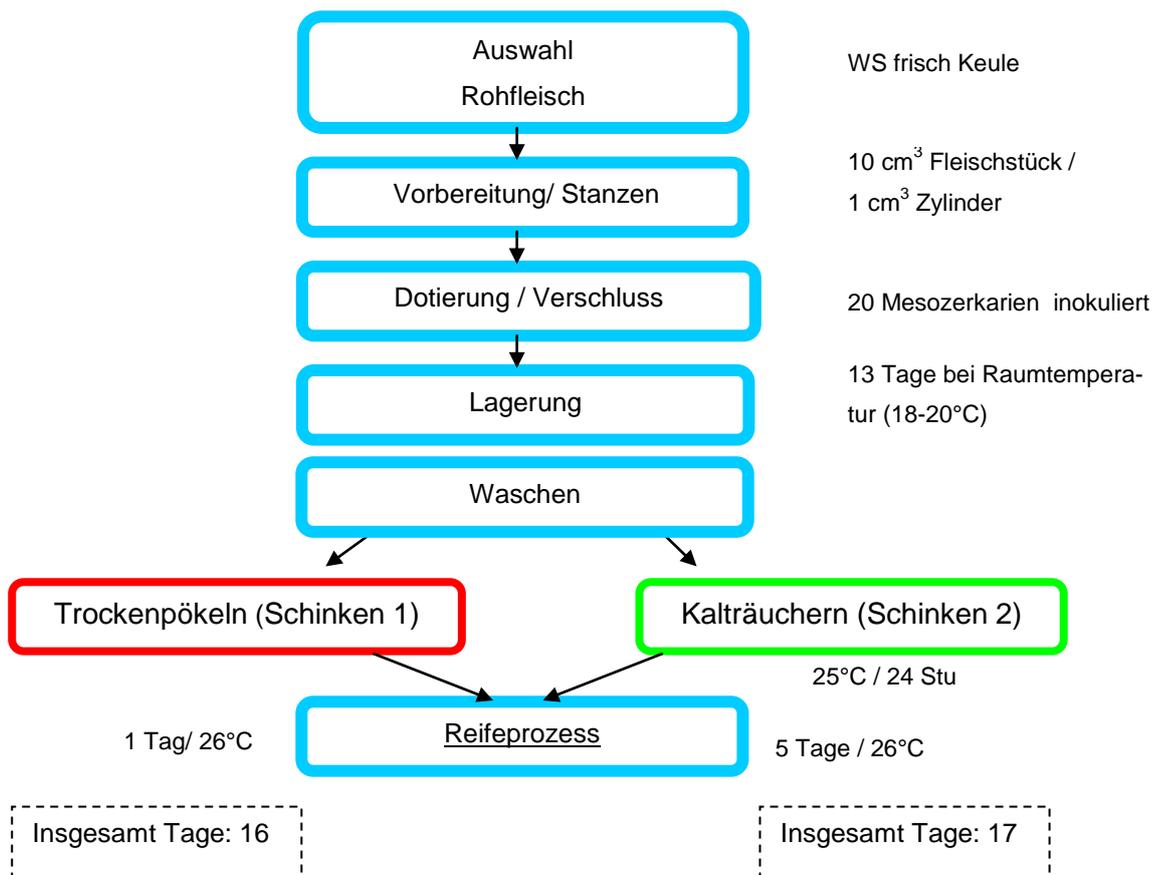


Abbildung 8: Flussdiagramm zum Verfahren über die Herstellung von Rohwürsten (Salami) aus infiziertem Fleisch von Wildschweinen und Waschbären.

2.4.1.3 Waschbär-Rohwürste "Knacker"

Als handelsübliche Bezeichnung für kleine Rohwürste wird in Deutschland häufig der Begriff "Knacker" verwendet. Die Rohwürste wurden unter Verwendung von infiziertem Waschbärenfleisch hergestellt. 0,9 kg zerkleinertes fettfreies Muskelfleisch wurde mit Schweinefett sowie 25,2 g NPS, 4,5 g Zucker vermischt und in natürliche Schweinedärme abgefüllt. Die Würste wurden in zwei Chargen aufgeteilt. Charge 1 wurde mit 20 Larven artifizial infiziert. Die Reifung erfolgte bei <math><16\text{ }^\circ\text{C}</math> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75-78 % über einen Zeitraum von 7 Tagen (Abb. 7). Anschließend wurden der pH-Wert gemessen und alle Produkte mittels AMT-Methode auf *A. mesocercariae* untersucht.

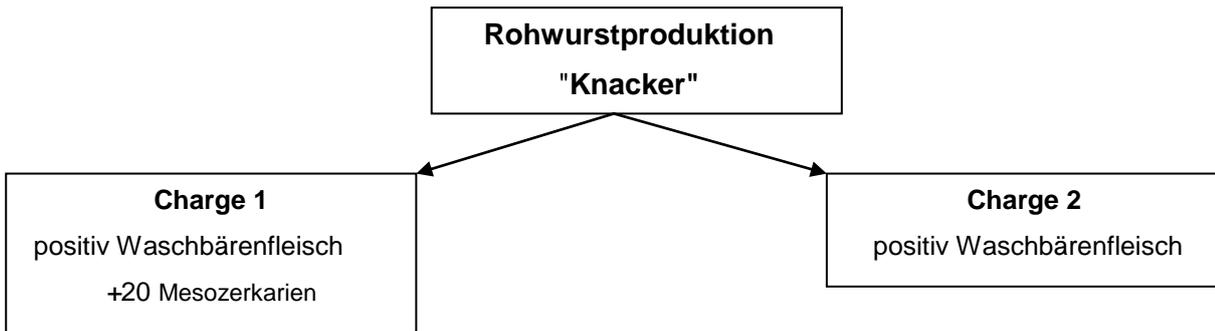


Abbildung 9: Herstellungsverfahren bei der Produktion von kurzgereiften Rohwürsten (Knacker) unter Verwendung verschiedener Ausgangsmaterialien.

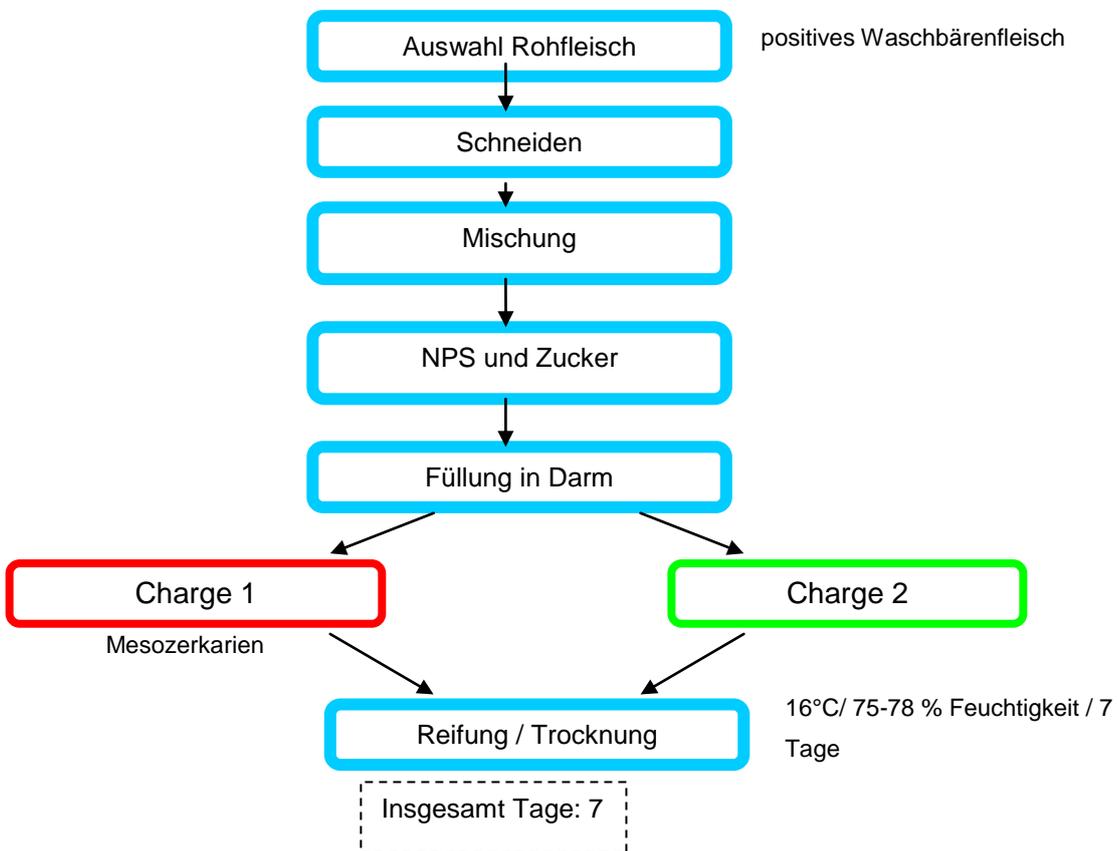


Abbildung 10: Flussdiagramm zum Herstellungsverfahren von kurzgereiften Rohwürsten (Knacker) aus infiziertem Wildschwein- und Waschbärenfleisch.

2.4.2 Tenazität gegenüber Natriumchlorid, Ethanol und Pepsin

2.4.2.1 Effekt von Natriumchlorid (NaCl)

Die Wirkung der Wasseraktivität (a_w -Wert) und des pH-Wertes auf Überlebensfähigkeit verschiedener lebensmittelassoziierter Krankheitserreger wurde in der Vergangenheit bereits in verschiedenen anderen Studien untersucht. Dabei wurde der Einfluss unterschiedlicher Salzkonzentrationen und deren Auswirkung auf die Vitalität von Parasiten, wie z.B. *A. alata* jedoch nicht erforscht. Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die maximale Überlebenszeit von *A. alata* Mesozerkarien gegenüber unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen zu bestimmen. Die mittels AMT- Methode gewonnenen Larven wurden in 20 ml Kunststoffbecher unter Zugabe von 0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 % NaCl-Lösung dotiert. Die Bestimmung erfolgte im Doppelansatz. Pro Versuch wurde je 20 Larven in die verschiedenen Salzkonzentrationen verbracht und bei 4 °C gelagert. Um die Vitalität der Larven zu kontrollieren wurden diese täglich mikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Larven zunächst aus dem Kühlschrank entnommen und erst nach Erreichen der Raumtemperatur die Aktivität (Beweglichkeit) bestimmt.

2.4.2.2 Effekt von Ethanol

Als häufigste Desinfektionsmittel im modernen Laborbereich werden heutzutage verschiedene Bleichmittel (Natriumhypochlorit), Ethanol und andere kommerzielle Misch-Präparate verwendet. Diese werden als Spray oder Flüssigkeit im Labor eingesetzt und nach festgelegter Einwirkzeit mit Papiertüchern wieder entfernt. Desinfektionsmittel sollten in kurzer Zeit die entsprechenden Zielorganismen abtöten. Wenn die Einwirkzeit zur Inaktivierung von Mikroorganismen länger als eine Stunde beträgt, sind diese Desinfektionsmitteln unpraktisch und ohne Nutzen (Weir et al. 2002). Ziel der folgenden Untersuchung war es, die Wirkung verschiedener Ethanol-Konzentrationen auf *A. mesocercariae* zu testen. In diesem Versuch wurden Ethanolkonzentrationen im Bereich von 0 %, 0,1 %, 0,15 %, 0,2 %, 0,25 %, 0,3 %, 0,35 %, 0,4 %, 0,45 %, 0,5 %, 0,55 %, 0,6 %, 0,65 % und 0,70 % getestet. 20 Larven je Ansatz wurden in ein 20 ml Becherglas dotiert und mit 10 ml der entsprechenden Ethanolkonzentrationen aufgefüllt und anschließend für 21 Tage im Kühlschrank gelagert. Zur täglichen Beprobung wurden die Behälter bis zum Erreichen von Raumtemperatur belassen und danach die Vitalität mikroskopisch bestimmt.

2.4.2.3 Effekt von Pepsin

Um die Überlebensfähigkeit der Mesozerkarien im Magen zu simulieren, wurde der Einfluss von Pepsin auf die Vitalität von *A. mesocercariae* bestimmt. Drei verschiedene Pepsinlösungen wurden für diese Versuchsreihe vorbereitet

- (i) 2,5 g Pepsin wurde in 50 ml (HCl)-Lösung gelöst. Der pH-Wert betrug 1,10 - 1,20. Die Lösung wurde 30 min bei 37 °C mit Hilfe eines Magnetrührers (250 U/min) gemischt.
- (ii) 2,6 g Pepsin, 5,0 g NaCl und 7,0 ml HCl wurden mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Danach wurde die Lösung bei 37 °C und pH 1,10-1,20 inkubiert (nach Dubey 1997).
- (iii) Entsprechenden den Vorschriften der VO(EG) 2075/2005 über die Vorschriften zur amtlichen Untersuchung auf Trichinellen wurden entsprechend dem aufgeführten Referenzverfahren folgende Konzentrationen vorbereitet: 16 ml HCl wurden mit 2 Liter Leitungswasser in einem 3-Liter-Becherglas vermischt. Das Becherglas wurde auf einer Heizplatte auf 44-46 °C erhitzt und dem HCl-Wasser-Gemisch 10 g Pepsin hinzugefügt und dieses Mittels Magnetrührer durchmischt. Nach der Herstellung der Lösungen wurden 20 *A. mesocercariae* hinzugefügt und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

2.4.3 Tenazität gegenüber Temperatur und Mikrowelle und Trocknung

2.4.3.1 Einfluss der Temperatur

Ziel der Untersuchungen war die Bestimmung des Einfluss unterschiedlicher Temperaturen (Erhitzen und Lagerung im Kühlraum) auf die Lebensfähigkeit von *A. mesocercariae*. Die Bestimmung der Resistenz von *Alaria alata* gegenüber hohen Temperaturen ist ein wichtiges Kriterium um sagen zu können, ob Kochen, Braten oder Grillen von infiziertem Wildschweinfleisch/-produkten ausreicht, diesen Erreger sicher abzutöten. 20 Larven wurde mit Hilfe der AMT-Methode isoliert und in ein 50 ml Behälter mit 10 ml Ringer-Lösung (Standard isotonischen Lösung 6,5 g NaCl, 0,42 g KCl, 0,25 g CaCl₂ und 1 mol Natriumbicarbonat in einem Liter destilliertem Wasser gelöst) dotiert. Anschließend wurden die Gefäße im Wasserbad auf verschiedene Temperaturen (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ± 0.5 °C) erhitzt. Jedes Temperatur/Zeit-Regime wurde fünfmal wiederholt. Die Becher wurden entnommen, wenn die Probe die gewünschte Temperatur erreicht hatte. Für die Untersuchung hinsichtlich der Lagerung im Kühlraum wurde Muskelgewebe aus PWS- Fleisch in 1 cm³ Stücke geschnitten, in 12 Gefrierbeutel (30 g pro Beutel) aufgeteilt und in der Kühlzelle bei 4-6 °C für bis zu 4 Wochen (28 Tage) gelagert. Pro Woche wurden 3 Beutel entnommen und mit Hilfe der AMT-Methode untersucht und die Motilität der Larven *in-vitro* beurteilt.

2.4.3.2 Tenazität gegenüber Mikrowellenbehandlung

Ziel dieser Untersuchung war die Bestimmung der Wirkung von Bestrahlung in Abhängigkeit zur Bestrahlungsdauer auf die Vitalität von *A. mesocercariae*. Die Erreger wurden dazu mit Mikrowellen-Strahlen (8 kW) für eine Zeitdauer von 15, 25, 29, 35, 45, 56, 75 und 90 Sekunden behandelt. Dazu wurde Wildschweinfleisch in kleine Stücke von ca. 5 cm³ geschnitten. In vorbereitete Stanzlöcher (Abb.11) wurden 20 *A. mesocercariae* dotiert. Um Larvenverluste zu vermeiden wurden die Stanzlöcher mit den zuvor entnommenen Fleischzylinder wieder verschlossen (Abb.12). Abschließend erfolgte die Bestrahlung in einer industriell verwendeten Mikrowelle (Abb.13)

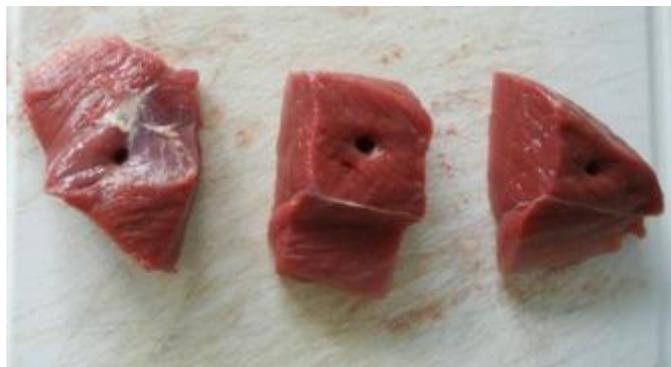


Abbildung 11: Vorbereitete Fleischstücke (Wildschwein) zur Dotierung von *A. alata*-Larven



Abbildung 12: Beimpfte Fleischproben (Wildschwein) nach Verschluss des Stanzloches



Abbildung 13: Verwendete Mikrowelle zur industriellen Bestrahlung von Lebensmitteln

2.4.3.3 Tenazität gegenüber Trocknung

0,2 ml Ringerlösung wurde auf einen Objektträger getropft und mit drei bis fünf *A. mesocercariae* dotiert. Bei Raumtemperatur (18-20 °C) wurde der Objektträger für 10, 20 und 30 Minuten getrocknet. Nach Abschluss des Trocknungsvorgangs wurden die Larven mit 2-3 Tropfen Ringerlösung rehydriert. Die Objektträger wurden unter dem Mikroskop untersucht und die Vitalität der Larven beurteilt.

2.5 Molekularbiologische Identifizierung und Differenzierung

Die Basis für die molekularbiologischen Untersuchungen bilden zum einen die Ergebnisse der Tenazitätsuntersuchungen, bei denen in der Vergangenheit immer wieder Isolate, welche eine erhöhte Widerstandskraft gegenüber verschiedenen Stressoren aufwiesen, auffielen. An solchen phänotypisch differenten Isolaten soll dann eine morphologische Differenzierung vorgenommen werden. Diese beinhaltet neben der exakten Vermessung der Mesozerkarien auch die Herstellung von Dauerpräparaten zur Etablierung einer Stammsammlung sowie die Durchführung verschiedener Färbetechniken zur besseren Bestimmung speziesinterner morphologischer Kriterien.

Parallel dazu soll eine Identifikation auf molekularbiologischer Ebene Aufschluss über die Verwandtschaftsbeziehungen eurasischer und amerikanischer *Alaria* Spezies bilden.

Dafür werden zurzeit sowohl *Alaria alata*-Isolate aus unterschiedlichen Regionen in Deutschland als auch aus anderen EU-Mitgliedsstaaten gesammelt.

So konnte in Kooperation mit Prof. Dr. Nikolay Lalkovski vom Nationalen Referenzlabor für parasitäre Zoonosen in Sofia, der erste *Alaria* spp. Mesozerkarien Fund in Bulgarien bestätigt werden. Der Fall wurde in einem internationalen Fachmagazin eingereicht (Publikation Parasitology Research s. Anhang).

Weitere internationale Kooperationen bestehen mit Dr. Walter Glawischnig von der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES), Prof. Dr. Peter Paulsen (Vetmeduni Vienna), Dr. Albert Marinculic (Faculty of Veterinary medicine University of Zagreb, Kroatien), Prof. Dr. Edoardo Pozio (Istituto Superiore di Sanità, Italien) und Frau Dr. Lidia Chitimia Institute for Diagnosis and Animal Health, Romania.

Weiterhin wurde eine Zusammenarbeit mit Frau Dr. Gudrun Wibbelt aus dem Leibniz-Institut für Zoo und Wildtierforschung (IZW, Berlin) Untersuchungen zur molekularbiologischen Identifikation von Trematodenlarven in fixierten Zungen von an Staupe verendeten Waschbären durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Doktorandin des IZW im Rahmen eines Hospitationsaufenthaltes im IfL Leipzig die Zungen präparieren und gemeinsam mit Herrn Hamedy eine molekularbiologische Charakterisierung mittels der im ersten Forschungsprojekt entwickelten PCR durchgeführt. Mittels unseres PCR -Verfahren wurde *Alaria alata* aus histologischen Präparaten nachgewiesen. Diese Ergebnisse werden in einer internationalen Zeitschrift erschienen.

2.5.1 Nachweis der *Alaria alata* mittel PCR

Im Rahmen des Forschungsprojektes konnte erfolgreich ein PCR-Protokoll für die molekularbiologische Detektion von *Alaria alata* Mesozerkarien entwickelt werden. Durch den Austausch von Isolaten mit Prof. Dr. Pozio konnte die genomische *Alaria alata*-Datenbank um die folgenden Teilsequenzen erweitert werden:

- EURLP583/08 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.
- EURLP52/10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.
- EURLP95/10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.
- EURLP96/10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.
- EURLP583/08 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- EURLP52/10 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- EURLP95/10 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial
- EURLP96/10 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial

2.5.1.1 DNA-Extraktion aus den Isolaten

Für die weitere Genotypisierung der *Alaria alata*-Isolate wurde die DNA extrahiert und bei -20°C gelagert. Die Extraktion von DNA erfolgte aus den Proben mit Hilfe des 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 (Pqclab, Germany) spectrophotometrisch bestimmt. Im Schnitt können so 100 µg DNA/g Gewebe hochmolekularer genomischer DNA für die spätere Amplifikation in der PCR gewonnen werden.

2.5.1.2 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für den PCR-Ansatz wurde ein Mastermix (ReddyMix™ PCR Master Mix, ABgene®, UK) verwendet.

50µl des Mixes sind wie folgt zusammengesetzt:

1,25 U	Taq DNA-Polymerase
75mM	Tris-HCL (pH 8,8 bei 25°C)
20mM	(NH4)2SO
1,5mM	MgCl2
0,01%	Tween® 20
0,2mM	jeweils von dATP, dCTP, dGTP und dTTP

Fällungsmittel und roter Farbstoff für die Elektrophorese.

Zunächst erfolgte die DME-Gen-Amplifikation

Für die PCR wurden folgende Primer genutzt:

Primer	sequence	Length	Tm
DME F	CTTAGCTGCGGGTTCCTGCT	20	56,0°C
DME R	CGGCACATAAGCAAATACCTCG	22	56,3°C

Für eine PCR-Reaktion wurden folgende Volumina genutzt:

Mastermix	20 µl
Primer DME F(100 pmol/µl)	0,12 µl
Primer DME R(100 pmol/µl)	0,12 µl
Template-DNA	2,5 µl.

Mastermix und Primer wurden entsprechend der Probenanzahl gemischt. Jeweils 20 µl dieses Mixes wurden pro Reaktion in PCR-Reaktionstubes pipettiert. Anschließend wurde das DNA-Template zugegeben. Zur Überprüfung der Reaktion wurden immer Positivkontrollen eine Negativkontrolle und ein no template control (NTC; Aqua bidest.) mitgeführt. Die PCR wurde mit dem Thermocycler Tpersonal (Biometra® GmbH, Deutschland) nach folgendem Amplifikationsschema durchgeführt:

Zyklusschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	94°C	2min	1
Denaturierung	94°C	15 sek	
Annealing	58°C	30 sek	35
Extension	72°C	45 sek	
Extension	72°C	5 min	1

2.5.1.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente wurden durch eine Gelelektrophorese der Größe nach im elektrischen Feld bei 90-125 V für 60 Minuten aufgetrennt. Die Größe der Stücke wurde durch Vergleich mit einem bekannten Größenmarker (100 bp DNA-Marker Plus) (peqLab, Biotechnologie GmbH, Deutschland) ermittelt. Die Gele bestanden aus 1,6-2,0 % Agarose, die in TBE-Puffer durch kurzes Aufkochen gelöst wurde. Zum Erkalten wurde die Agaroselösung in einen flachen Gelträger der horizontalen Gelelektrophorese (peqLab, Biotechnologie GmbH, Deutschland) gegossen. Die DNA-Proben wurden in die Taschen des Gels aufgetragen, und die mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer wurde an das elektrische Feld angeschlossen. Neben den Proben wurden auch Positiv-, Negativkontrolle und NTC sowie Längenmarker auf das Gel aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde die DNA mit 1%-iger wässriger Ethidiumbromidbadlösung gefärbt und im UV-Licht sichtbar gemacht. Wenn es sich um *Alaria* spp. handelte, konnte unter UV-Licht ein 300 bp großes Fragment identifiziert werden.

2.5.1.4 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Die Analyse der Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der *Alaria*-Populationen mittels AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)-Technik soll im weiteren Verlauf des Projekts erfolgen. Dafür wurde die DNA aus den Larven extrahiert und bei -20 gelagert. Die AFLP-Typisierung besteht aus vier Schritten:

1. Restriktionsverdau der DNA

Etwa 20 ng chromosomaler DNA wurden gleichzeitig mit *Hind III* und *Hha I* (beide Enzyme: Promega, GmbH, Mannheim, Deutschland) bei 37°C für 1 h verdaut.

Verwendete Enzyme

Enzym	Erkennungs-Sequenz
<i>Hha I</i>	5'- G C G [▼] C - 3' 3'- C [▲] G C G - 5'
<i>Hind III</i>	5' - A [▼] A G C T T - 3' 3' - T T C G A [▲] A - 3'

Restriktionsansatz (pro Probe):	<i>HhaI</i> (20000U/ml)	0,2µl
	<i>HindIII</i> (10000U/ml)	0,2µl
	BSA (10mg/ml)	0,1µl
	NEBuffer2 10x *	0,8µl
	Aqua bidest.	8,0 µl

* Zusammensetzung des Puffers (NBBuffer2 10X) :

50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT; pH 7,9 bei 25°C

2. Ligation mit spezifischen Adaptern:

Verwendete Adapter:

Adapter	Erkennungs-Sequenz
Hhaad 1	5'-GAC GAT GAG TCC TGA TCG-3'
Hhaad 2	5'-ATC AGG ACT CAT CG-3'
Hindad 1	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'
Hindad 2	5'-AGC TGG TAC GCA GTC-3'

Ligationsansatz (pro Probe):	Restriktionsansatz (Schritt 1)	10,0µl
	Ligase (3U/µl)*	0,4 µl
	Aqua bidest.	,4µl
	Adaptermix **	2,0µl

* Ligase(3U/µl) enthält die ATP und DTT bereits.

** Der Adaptermix ist aus jeweils einem Teil Hindad 1 und Hindad 2 und zu je zehn Teilen Hhaad 1 und Hhaad 2 zusammengesetzt. Alle Adapter hatten eine Konzentration von jeweils 100 pmol/µl.

Die Inkubation des Ansatzes erfolgt für zwei Stunden bei 37°C.

3. Präselektive PCR

Das totale Reaktionsvolumen der Ligation von Schritt 2 wurde mit 180µl Aqua bidest verdünnt. Danach wurden 4µl in einer neuen Tube pipettiert.

Der PCR-Ansatz, von welchem 18µl zu den 4µl hinzu pipettiert wurden, war wie folgt zusammengesetzt (pro Probe):

Mastermix	15µl
MgCl ₂ (25mM)	0,8µl
Hhapre (100 pmol/µl)	2,0µl
Hindpre (100 pmol/µl)	0,4µl

Die verwendeten Primer und deren Sequenzen:

Primer	Erkennungs-Sequenz
Hhapre	5'-GAT GAG TCC TGA TCG C-3'
Hindpre	5'-GAC TGC GTA CCA GCT T-3'

Das Probengefäß wurde verschlossen und in den Themocycler gestellt, anschließend wurde das folgende Cyclingschema durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
Elongation	72°C	2 min
Denaturierung	94°C 56°C 72°C	20 sec
Primerannealing		30 sec
Elongation		2 min

} 20 Zyklen

4. Selektive PCR

Die präselektive PCR-Lösung vom Schritt 3 wurde mit 180 µl Aqua bidest. verdünnt. Danach wurden 4µl der verdünnten Lösung in ein neues Tube pipettiert und folgende Komponenten dazugegeben:

Mastermix	15µl
MgCl ₂ (25mM)	0,8µl
Hhasel (100 pmol/µl)	2,0µl
Hindsel (100 pmol/µl)	0,4µl

Die verwendete Primer und deren Sequenzen:

Primer	Erkennungs-Sequenz
Hhasel	5'-GAT GAG TCC TGA TCG CA-3'
Hindsel	5'-GAC TGC GTA CCA GCT TA-3'

Anschließend wurde das Probengefäß verschlossen und in den Thermocycler gestellt. Die Selektiv-PCR wurde unter folgendem Cyclingschema durchgeführt:

Schritt		Temperatur	Zeit
Denaturierung	} 10 Zyklen	94°C	20 sec
Primerannealing		66°C	30 sec
Elongation		72°C	2 min
Denaturierung	} 40 Zyklen	94°C	20 sec
Primerannealing		56°C	30 sec
Elongation		72°C	2 min
Annealing		60°C	30 min

5. Gelelektrophorese

Die so erhaltenen Amplifikate wurden über Nacht im Kühlschrank gelagert. Danach erfolgte die Elektrophorese unter Nutzung eines 12,5%igen Polyacrylamidgels (ExcelGel DNA Analysis Kit, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland). Das Gel wurde auf der dünn mit Paraffinöl bestrichenen Elektrophoresekühlplatte (Amersham Biosciences) auf 18°C vorgekühlt. Danach wurden die Proben, der DNA-Marker (XII DNA-Sizer, Peqlab, Erlangen, Deutschland), die Negativkontrolle und der Referenzstamm aufgetragen. Nach Anbringen der Gelelektroden und Verschluss der Elektrophoresekammer wurden die DNA-Fragmente bei einer Stromstärke von 400 V in einem Zeitraum von 120 min aufgetrennt.

Nach Beenden der Elektrophorese wurden die PCR-Amplifikate durch Silberfärbung mit einem DNA Silver Staining Kit (Amersham Biosciences, Sweden) sichtbar gemacht (Tabelle 15).

Tabelle 15: Ablauf der Silberfärbung

Schritt	Lösung	Dauer
1	Fixierungs- Lösung	30 min
2	Silber- Lösung	30 min
3	Wasser	2 min
4	Entwicklungs- Lösung	3 min
5	Stopp- und Fixierungs- Lösung	30 min

Die Bandenmuster wurden mit einer CCD-Videokamera (Chemilmager 4400, Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) aufgenommen und mit Hilfe einer Dokumentationssoftware in ein für die Auswertungssoftware lesbares Dateiformat (TIF, Tagged Image File) überführt.

Die Analyse der AFLP-Bandenmuster erfolgte mit Hilfe der AlphaEase Software Version 5.5 (Alpha Innotech) und die Fragmentanalyse wurde mit Hilfe der BioNumerics Version 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) durchgeführt. Dazu wurden nur die AFLP-Banden im Bereich zwischen 34 bis 501 bp analysiert. Nach der Normalisierung und dem Abzug des Hintergrunds wurden die Banden gegen einen Referenzstandard verglichen. Ähnlichkeiten zwischen den Banden wurde unter Zuhilfenahme der Dice Koeffizienten berechnet. Zur eigentlichen Cluster-Analyse der AFLP-Profile fand der ungewichtete Paarvergleich (unweighted pair-group method using arithmetic averages [UPGMA]) Anwendung.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung des neu entwickelten Verfahrens

3.1.1 Testung verschiedener Medien

Es wurden 20 Versuche mit Probenmaterial verschiedener Gewebe von vier verschiedenen zuvor mit der AMT positiv getesteten Wildschweinen durchgeführt. Von allen fünf getesteten Medien, Leitungswasser, Ringerlösung, Ringer-Laktat-Lösung, 0,9 %ige Natrium-Chlorid-Lösung und 5 %ige Glukoselösung, wurde bei Leitungswasser im Gegensatz zu den anderen vier Medien eine signifikant höhere Menge an Larven gefunden (Abbildung 14).

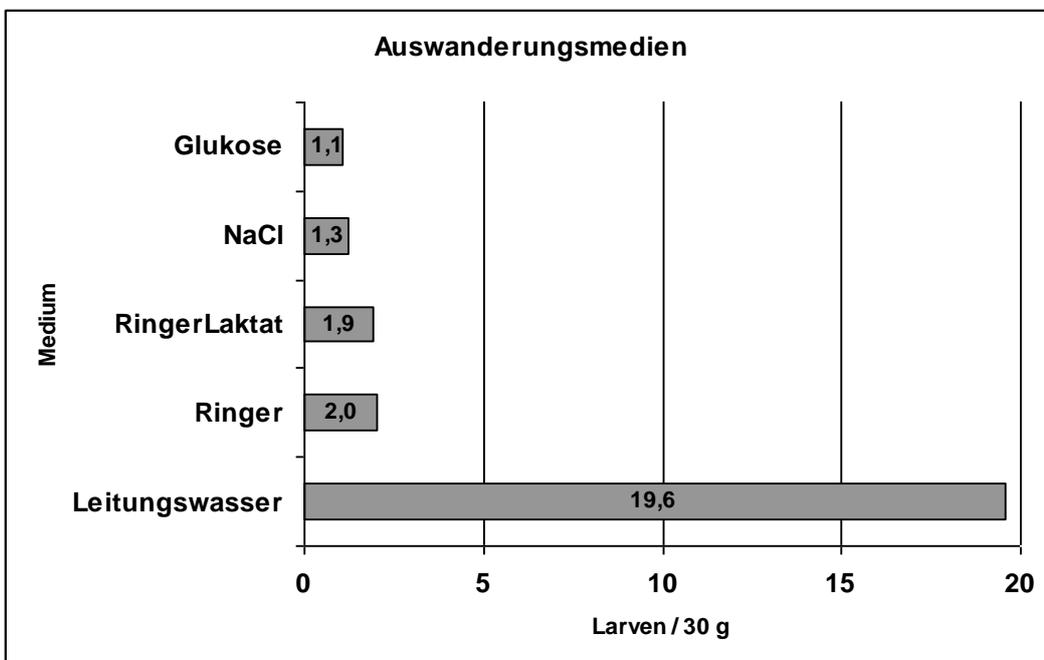


Abbildung 14: Anzahl ausgewanderter Larven in unterschiedlichen Medien

3.1.2 Testung verschiedener Zerkleinerungsgrade

Es wurden 20 Versuche mit Probenmaterial verschiedener Gewebe von sechs verschiedenen zuvor mit der AMT positiv getesteten Wildschweinen durchgeführt. Bei den verschiedenen Zerkleinerungsgraden konnte kein signifikanter Unterschied bei der Anzahl an ausgewanderten Larven festgestellt werden (Abbildung 15).

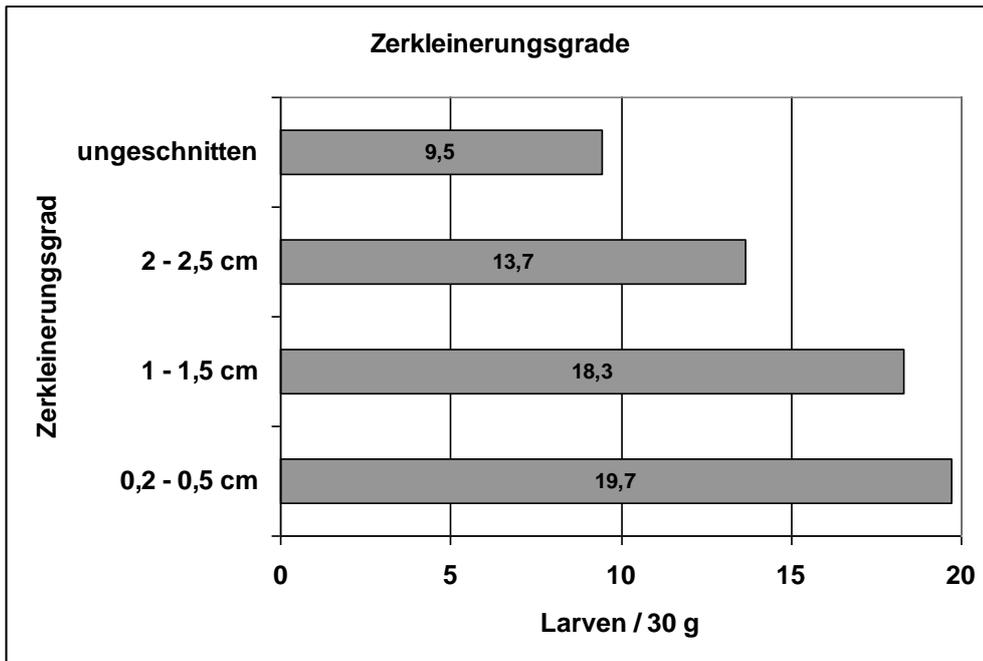


Abbildung 15: Anzahl ausgewanderter Larven bei verschiedenen Zerkleinerungsgraden

3.1.3 Testung verschiedener Auswanderungszeiten

Es wurden 20 Versuche mit Probenmaterial verschiedener Gewebe von einem zuvor mit der AMT positiv getesteten Dachs und zwei Wildschweinen durchgeführt. Es zeigte sich, dass bereits nach 30 Minuten zwischen 40 % und 100 %, im Durchschnitt 82,5 %, der gesamten Larven ausgewandert und abgesunken waren (Abbildung 16).

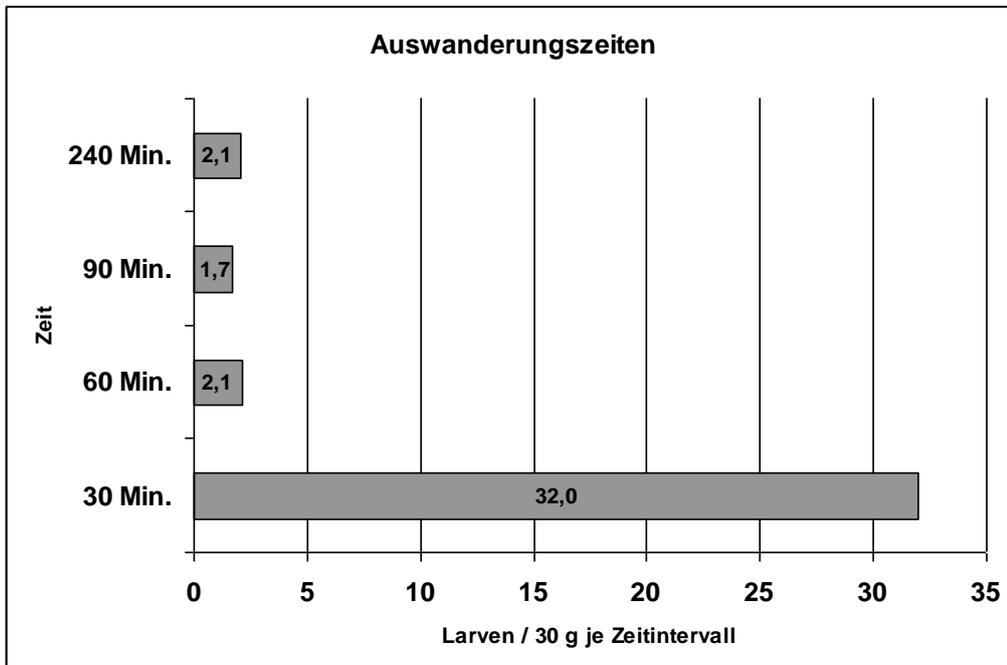


Abbildung 16: Anzahl ausgewanderter Larven nach 30, 60, 90 und 240 Minuten

3.2 Ringversuch

Die Auswertung erfolgte für jeden Teilnehmer nach der Anzahl der richtig erkannten DME-positiven bzw. -negativen Muskelproben sowie der Zahl der falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnisse (qualitative Auswertung). Weiterhin wurden die Ergebnisse jedes Teilnehmers mit Anzahl der tatsächlich in der Probe vorhandenen Larven verglichen (quantitative Auswertung).

3.2.1 Ringversuch Teil I

Insgesamt nahmen in diesem Teil des Ringversuchs 15 Laboratorien aus 9 Bundesländern (Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Brandenburg, Berlin, Niedersachsen, Schleswig-Holstein, Baden-Württemberg, Bayern) am Ringversuch teil.

3.2.1.1 Qualitative Auswertung

Alle Teilnehmer führten die AMT gemäß der mitgelieferten SOP durch. Bei 40% aller Teilnehmer erfolgte die Auswertung der Proben mit einem Stereomikroskop. 46,7% der Teilnehmer benutzten ein Trichinoskop, ein Teilnehmer verwendeten beide Methoden und ein Labor machten keine Angaben. Die durchschnittliche Anzahl der gefundenen Larven unterschied sich bei den eingesetzten Auswertungsmethoden nicht.

Von den zu bewertenden 60 DME-positiven Proben wurden Larven in 58 Proben (96,7 %) gefunden. 2 Ergebnisse erwiesen sich als falsch-negativ (3,3 %). Von den 30 negativen Proben wurden 29 (96,7 %) korrekt und 1 als falsch-positiv (3,3%) beurteilt. Die qualitativen Ergebnisse sind in der Abb.17 graphisch dargestellt.

3.2.1.2 Quantitative Auswertung

Insgesamt 43 (47,8%) der 90 Proben wurden von den Ringversuchsteilnehmern korrekt gezählt. Bei neun weiteren Proben (10%) wurde lediglich eine Larve übersehen, acht weitere Proben (8,9%) wiesen zwei fehlende Larven auf. Die weitere Aufschlüsselung der Fehlerhäufigkeiten ist der Abbildung 18 zu entnehmen.

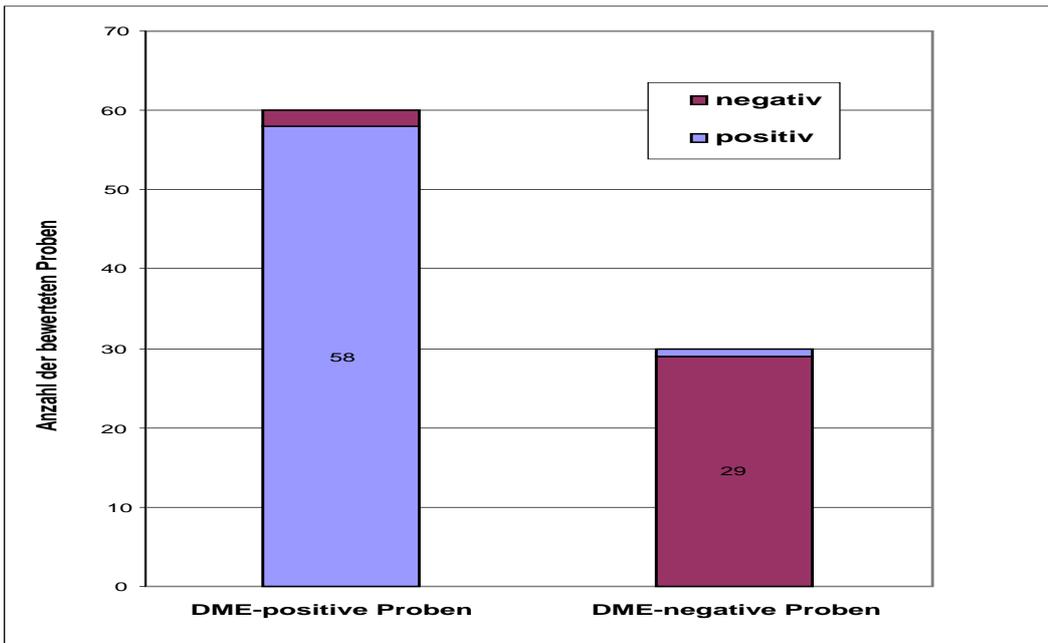


Abbildung 17: Ergebnis der qualitativen Auswertung der im Rahmen des Ringversuches an die Teilnehmer versendeten Proben

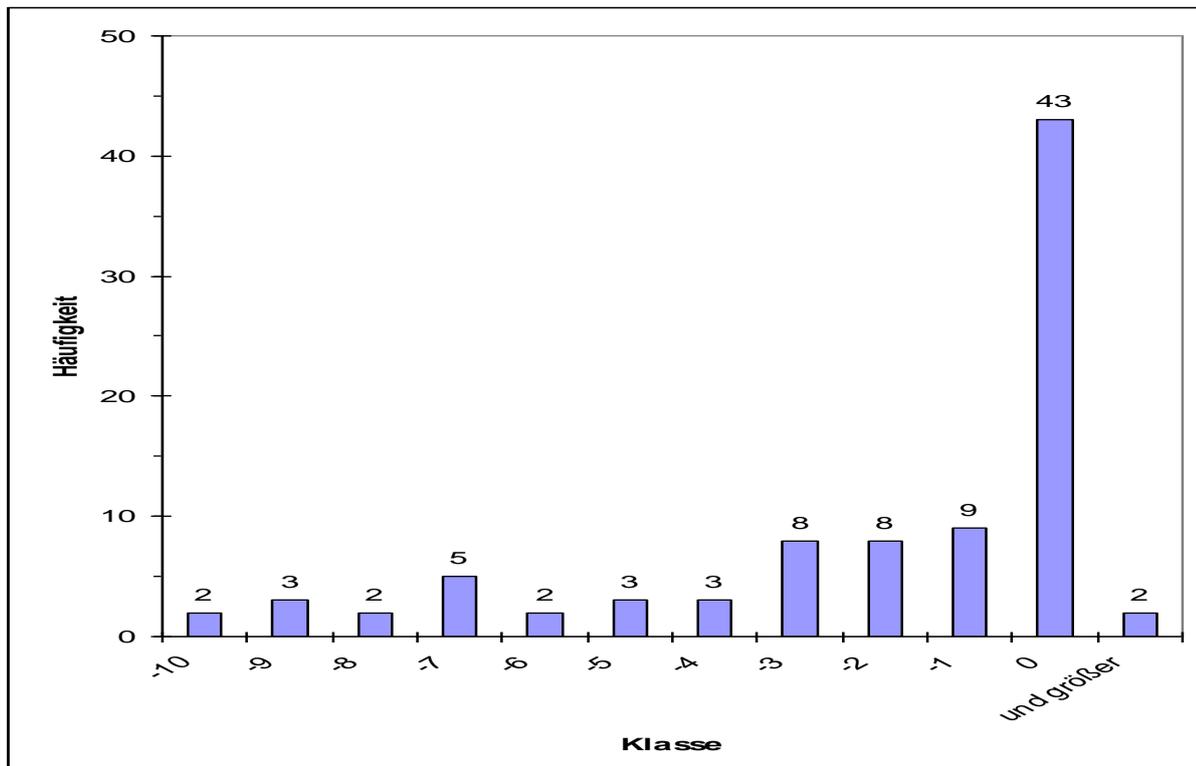


Abbildung 18: Aufschlüsselung der Fehlerhäufigkeiten (Abweichung von Larven-Sollwert) bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung für die einzelnen Labore zeigen, dass nur ein Teilnehmer (6,7%) alle positiven Proben gleichzeitig qualitativ und quantitativ richtig bewertet hat. Ein weiterer Teilnehmer (6,7%) hat bei je einer positiven Probe eine Larve über- bzw. unterzählt. Drei Laboratorien (20%) haben mehr als 70% der in den Proben vorhandenen Muskelegel identifizieren können. Insgesamt haben somit 33,3% der teilnehmenden Laboratorien $\geq 70\%$ der in den Proben befindlichen Larven sicher identifizieren können.

Die Abbildungen 19 und 20 zeigen die Ergebnisse der quantitativen Analyse aufgeschlüsselt nach Laboratorien und Larven Sollwert.

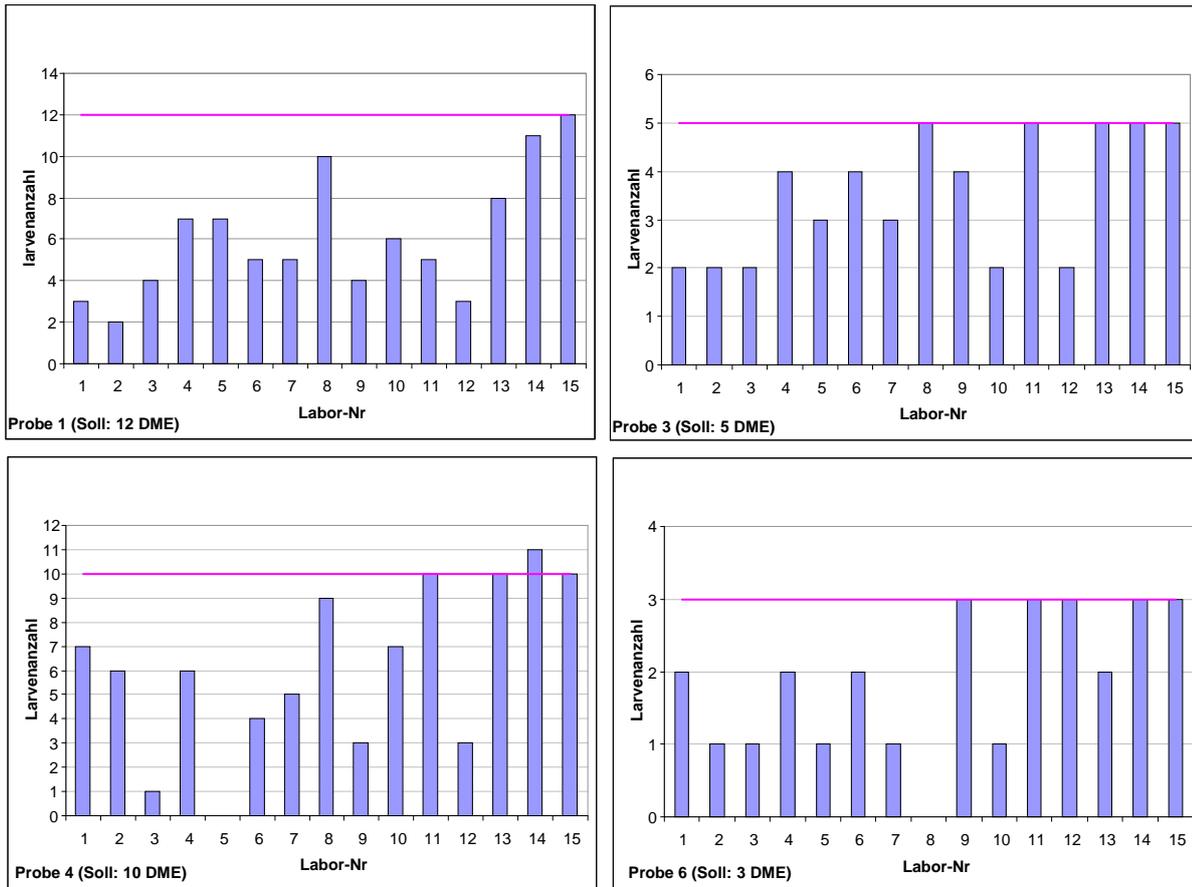


Abbildung 19: Abweichung der Ringversuchsteilnehmer vom Larven-Sollwert bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben

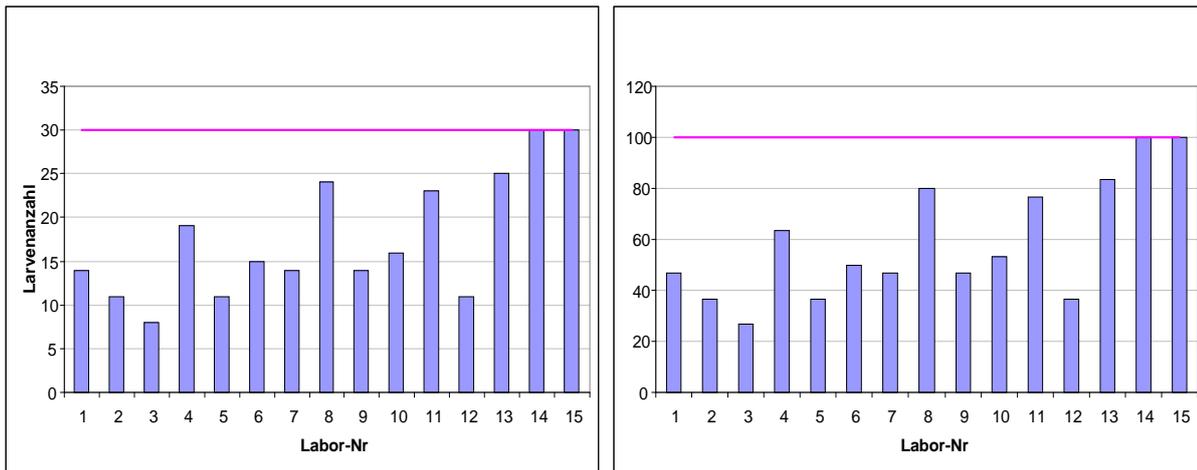


Abbildung 20: Zusammenfassende Darstellung der Laborperformance bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben

3.2.2 Ringversuch Teil II

Insgesamt nahmen 13 deutsche Laboratorien aus 8 Bundesländern (Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Brandenburg, Niedersachsen, Schleswig-Holstein, Nordrhein-Westfalen Baden-Württemberg) sowie ein Labor aus Österreich am Ringversuch teil. Zwei Laboratorien konnten aufgrund fehlender Teilergebnisse nicht in die Auswertung einbezogen werden und werden den Ringversuch im nächsten Durchlauf wiederholen.

3.2.2.1 Qualitative Auswertung

Alle Teilnehmer führten die AMT gemäß der mitgelieferten SOP durch. Bei 33,3% aller Teilnehmer erfolgte die Auswertung der Proben mit einem Stereomikroskop. 66,7% der Teilnehmer benutzten ein Trichinoskop. Die durchschnittliche Anzahl der gefundenen Larven unterschied sich bei den eingesetzten Auswertungsmethoden nicht.

Von den zu bewertenden 48 DME-positiven Proben wurden Larven in 47 Proben (97,9 %) gefunden. 1 Ergebnis erwies sich als falsch-negativ (2,1 %). Von den 24 negativen Proben wurden 24 (100 %) korrekt und keine Probe als falsch-positiv beurteilt. Die qualitativen Ergebnisse sind in der Abb. 21 graphisch dargestellt.

3.2.2.2 Quantitative Auswertung

Insgesamt 33 (45,8%) der 72 Proben wurden von den Ringversuchsteilnehmern korrekt gezählt. 14 Proben (19,4%) wiesen eine fehlende Larve auf, bei acht weiteren Proben wurden zwei Larven übersehen. Bei zwei Proben (2,7%) wurde eine Larve zuviel gezählt. Die weitere Aufschlüsselung der Fehlerhäufigkeiten ist der Abbildung 22 zu entnehmen.

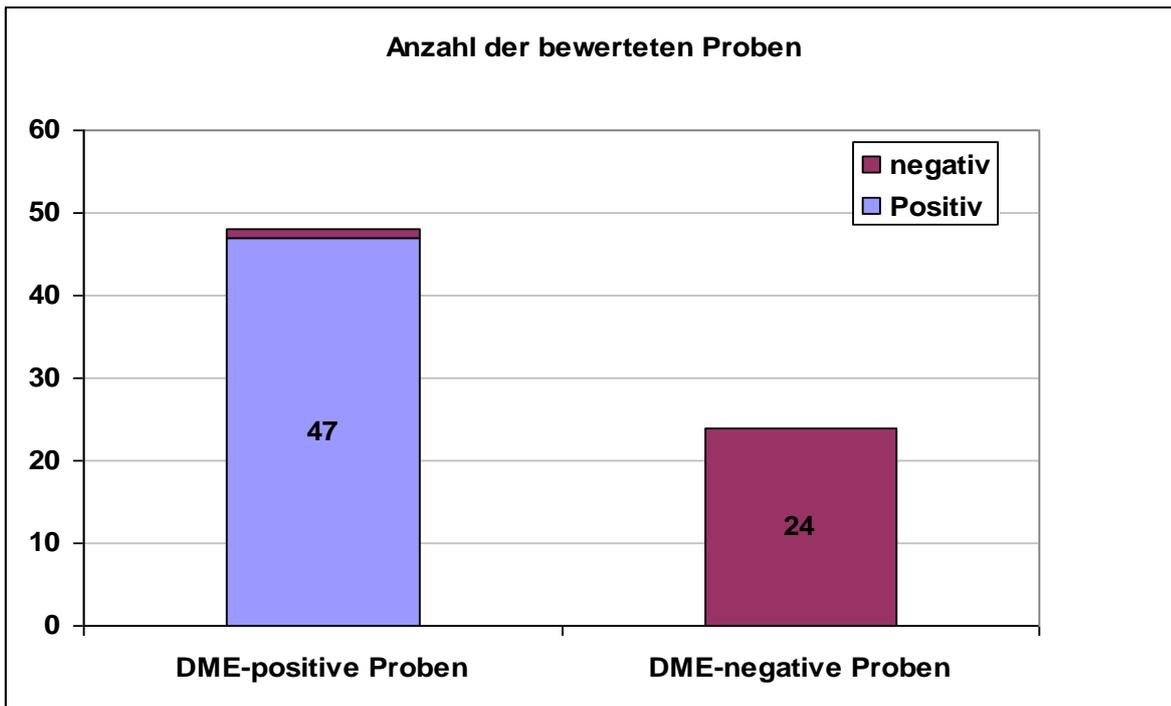


Abbildung 21: Ergebnis der qualitativen Auswertung der im Rahmen des Ringversuches an die Teilnehmer versendeten Proben

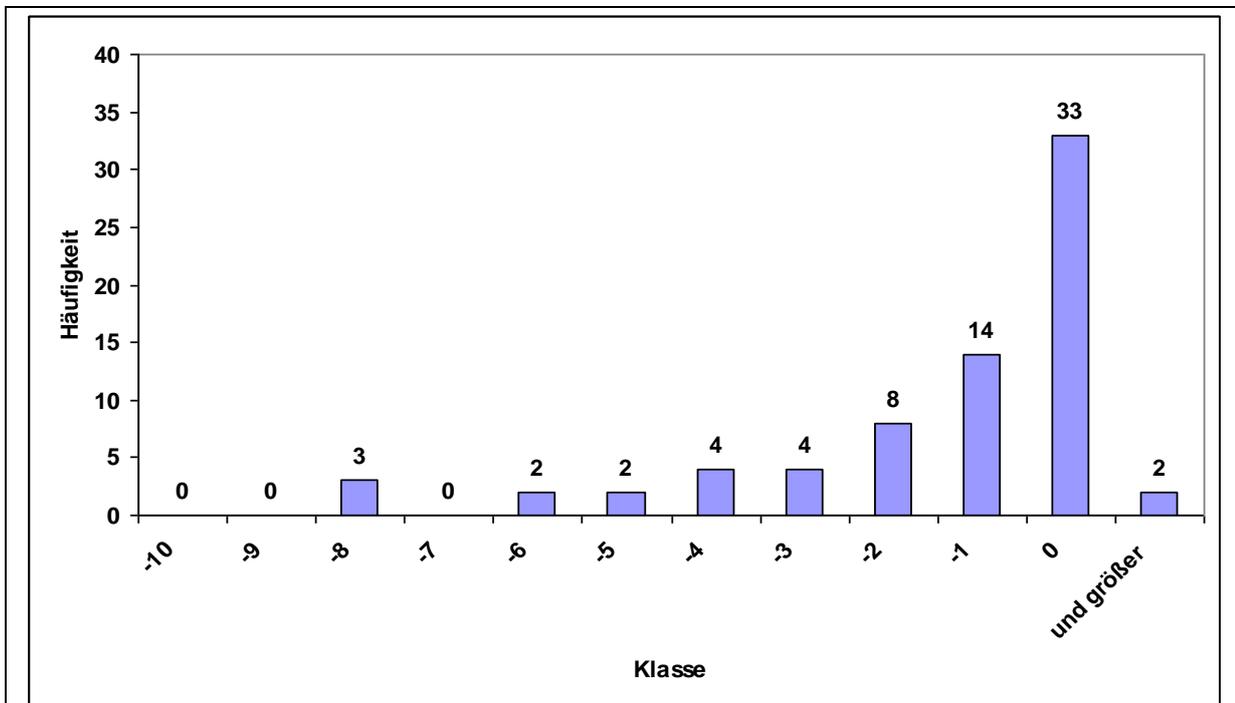


Abbildung 22: Aufschlüsselung der Fehlerhäufigkeiten (Abweichung von Larven-Sollwert) bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung für die einzelnen Labore zeigen, dass kein Teilnehmer alle positiven Proben gleichzeitig qualitativ und quantitativ richtig bewertet hat. Ein Teilnehmer hat nur bei einer Probe eine Larve übersehen und konnte so insgesamt 29 (96,7 %) der 30 der eingesetzten Larven identifizieren. Ein weiterer Teilnehmer fand 27 (90%) der Larven. Insgesamt bewegten sich die Detektionsraten in den positiven Proben zwischen 12 (40,0 %) und 29 (96,7%) DME.

Nach einem allgemeinen Richtwert sollten mindestens 70 % aller in die Fleischklopse verbrachter Larven identifiziert werden. Die Gesamtzahl aller Larven in den vier positiven Proben lag bei 30 Larven. Sieben (58,3%) der 12 in die Auswertung einbezogenen Laboratorien konnten $\geq 70\%$ der in den Proben befindlichen Larven sicher identifizieren. Die Abbildungen 23 und 24 zeigen die Ergebnisse der quantitativen Analyse aufgeschlüsselt nach Laboratorien und Larven Sollwert.

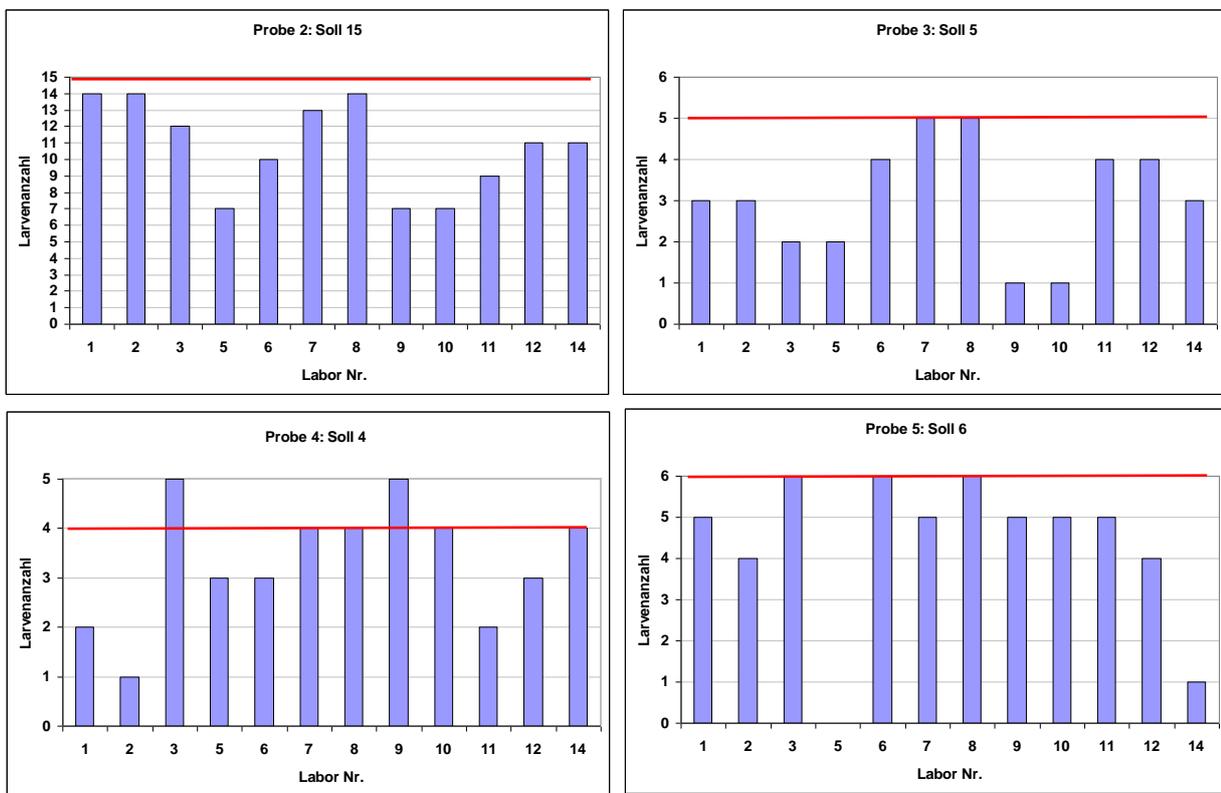


Abbildung 23: Abweichung der Ringversuchsteilnehmer vom Larven-Sollwert bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben

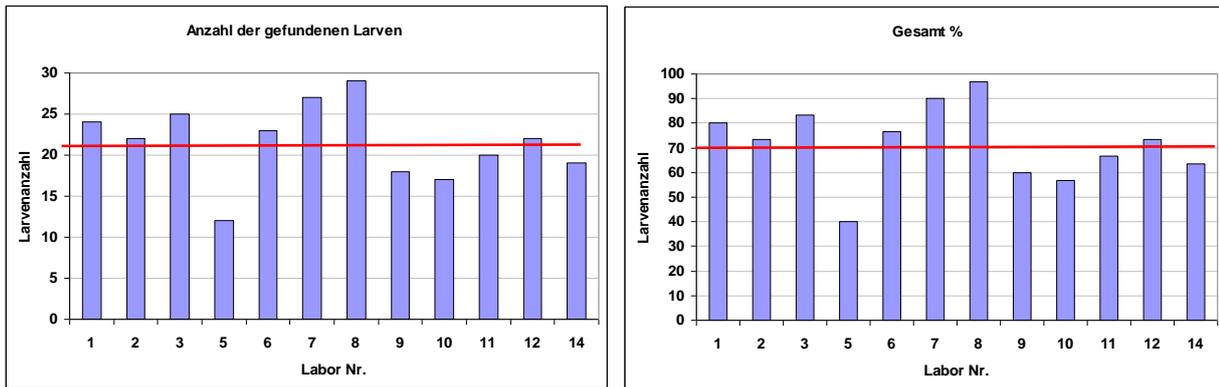


Abbildung 24: Zusammenfassende Darstellung der Laborperformance bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben. Die Markierung zeigt den Cut-Off von 21 (70 %) der 30 eingesetzten Larven.

3.2.3 Ringversuch Teil III

Insgesamt nahmen 13 deutsche Laboratorien aus 6 Bundesländern (Sachsen, Sachsen-Anhalt, Berlin, Thüringen, Brandenburg, Niedersachsen) am Ringversuch teil.

3.2.3.1 Qualitative Auswertung

Alle Teilnehmer führten die AMT gemäß der mitgelieferten SOP durch. Bei 15,4% aller Teilnehmer erfolgte die Auswertung der Proben mit einem Stereomikroskop. 84,6% der Teilnehmer benutzten ein Trichinoskop. Die durchschnittliche Anzahl der gefundenen Larven unterschied sich bei den eingesetzten Auswertungsmethoden nicht.

Von den zu bewertenden 52 DME-positiven Proben wurden Larven in 51 Proben (98,01 %) gefunden. 1 Ergebnis erwies sich als falsch-negativ (1,92 %). Von den 26 negativen Proben wurden 26 (100 %) korrekt und keine Probe als falsch-positiv beurteilt. Die qualitativen Ergebnisse sind in der Abb. 25 graphisch dargestellt.

3.2.3.2 Quantitative Auswertung

Insgesamt 15 (28,8%) der 52 positiven Proben wurden von den Ringversuchsteilnehmern korrekt ausgezählt. 15 weitere Proben (28,8%) wiesen eine fehlende Larve auf, bei acht Proben wurden zwei Larven übersehen. Die weitere Aufschlüsselung der Fehlerhäufigkeiten ist der Abbildung 26 zu entnehmen.

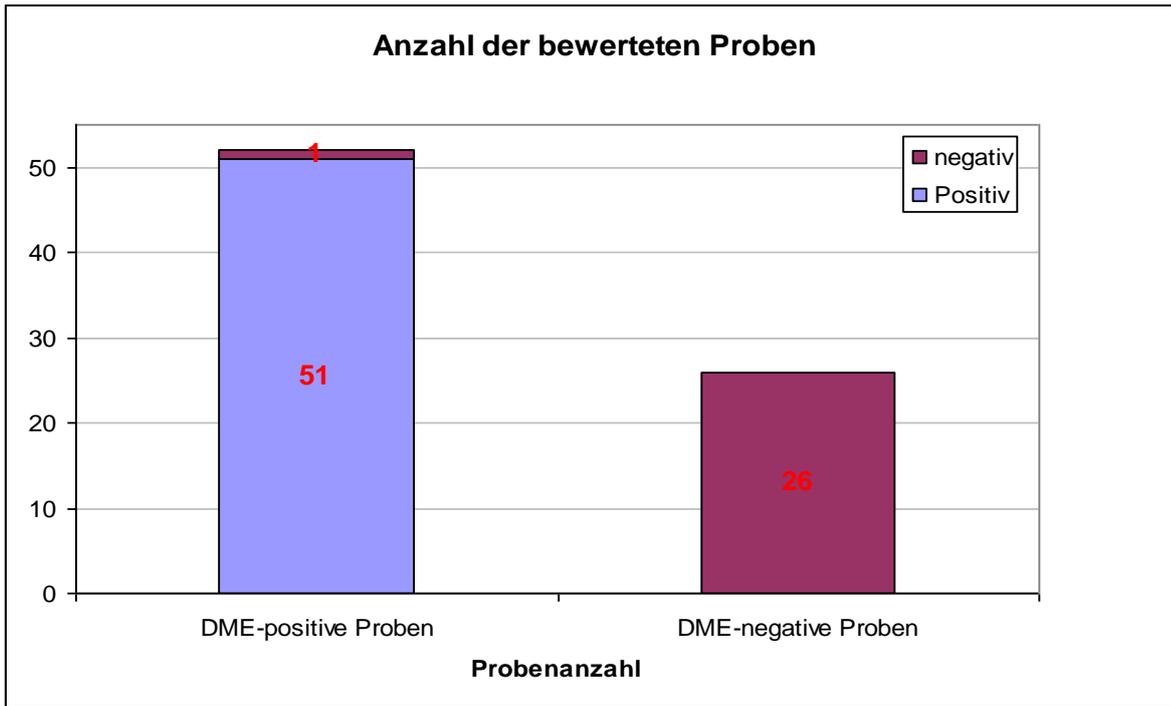


Abbildung 25: Ergebnis der qualitativen Auswertung der im Rahmen des Ringversuches an die Teilnehmer versendeten Proben

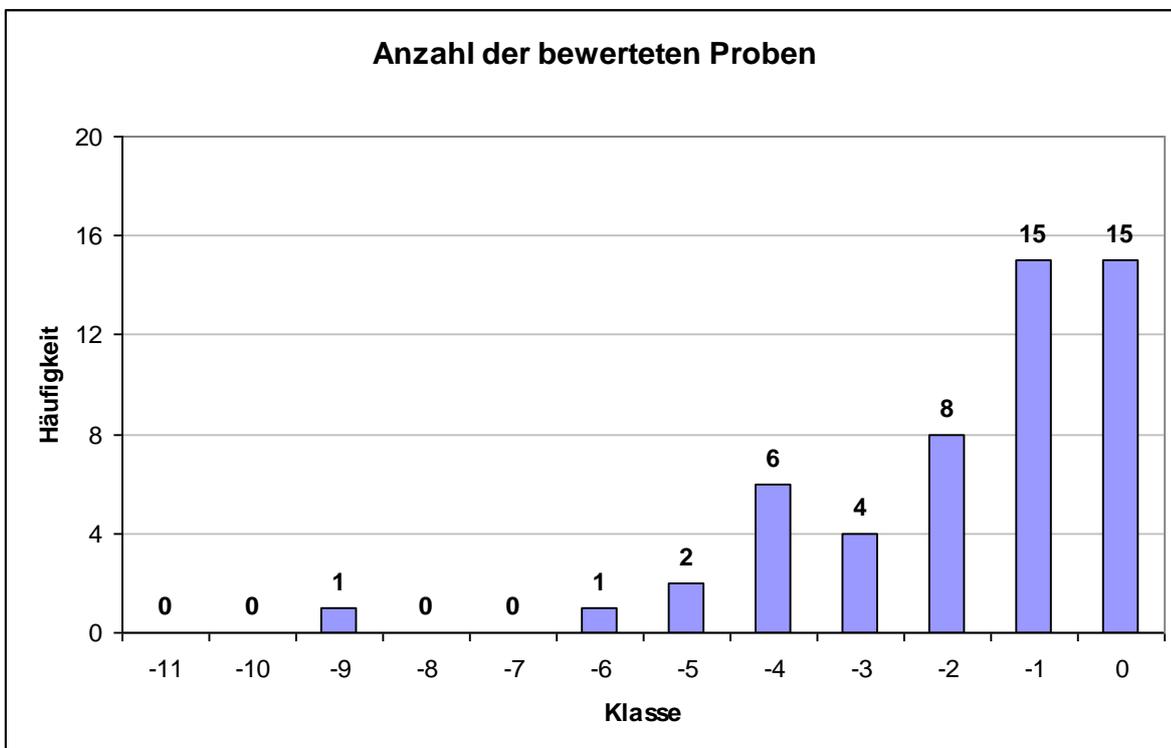


Abbildung 26: Aufschlüsselung der Fehlerhäufigkeiten (Abweichung von Larven-Sollwert) bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung für die einzelnen Labore zeigen, dass kein Teilnehmer alle positiven Proben gleichzeitig qualitativ und quantitativ richtig bewertet hat. Zwei Teilnehmer haben nur bei einer Probe eine Larve übersehen und konnten so insgesamt 29 (96,7 %) der 30 der eingesetzten Larven identifizieren. Zwei weitere Teilnehmer fanden 28 (93,3%) der Larven. Insgesamt bewegten sich die Detektionsraten in den positiven Proben zwischen 13 (43,33 %) und 29 (96,7%) DME.

Nach einem allgemeinen Richtwert sollten mindestens 70 % aller in die Fleischklopse verbrachter Larven identifiziert werden. Die Gesamtzahl aller Larven in den vier positiven Proben lag bei 30 Larven. Neun (69,2%) der 13 in die Auswertung einbezogenen Laboratorien konnten $\geq 70\%$ der in den Proben befindlichen Larven sicher identifizieren. Die Abbildungen 27 und 28 zeigen die Ergebnisse der quantitativen Analyse aufgeschlüsselt nach Laboratorien und Larven Sollwert.

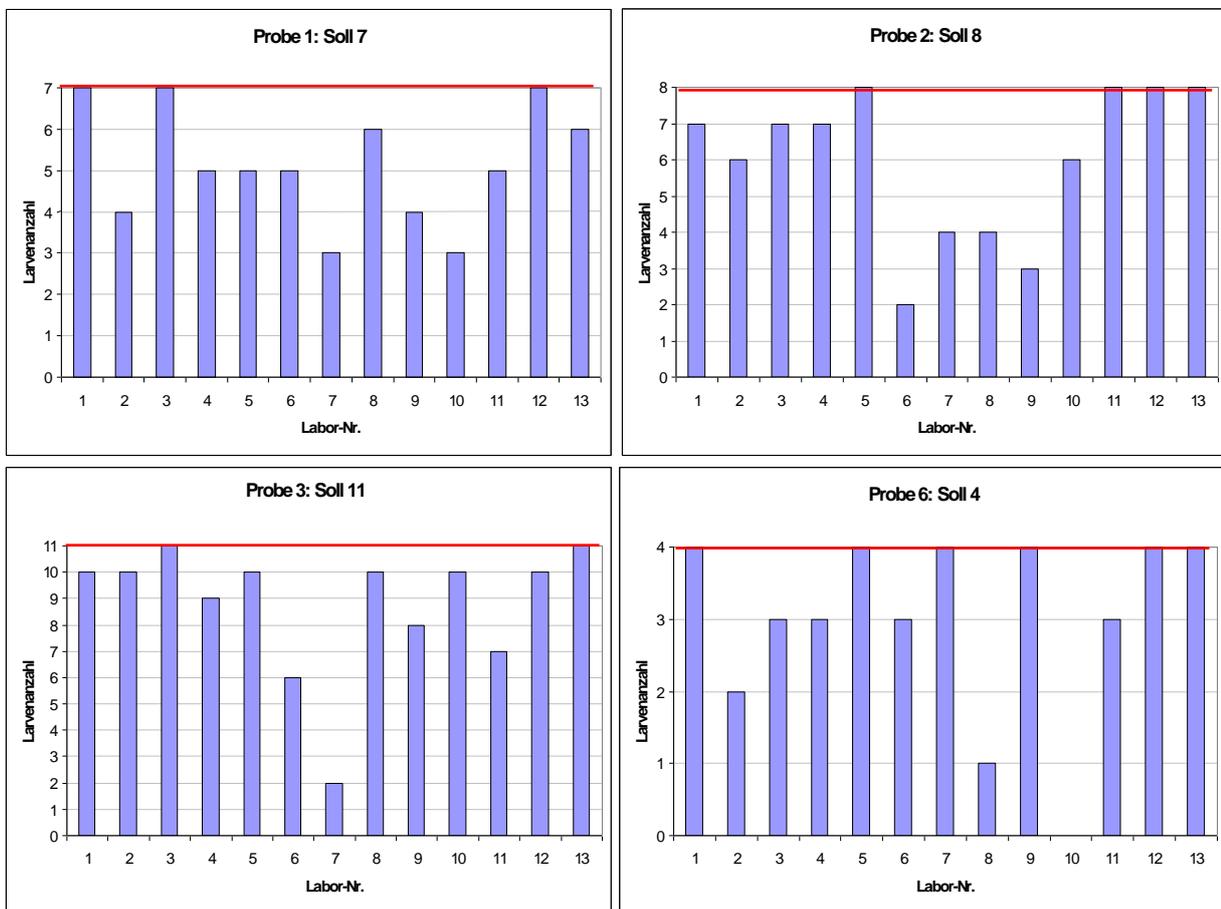


Abbildung 27: Abweichung der Ringversuchsteilnehmer vom Larven-Sollwert bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben

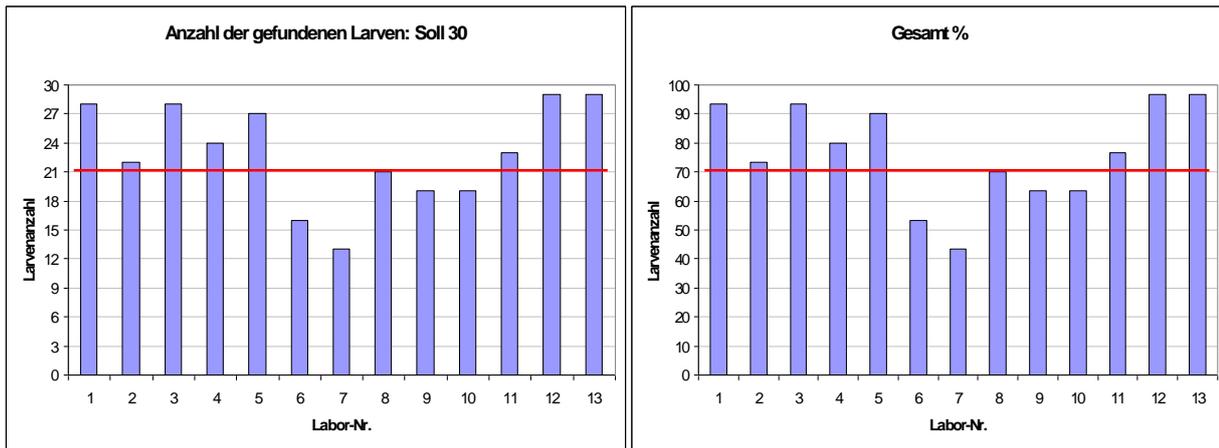


Abbildung 28: Zusammenfassende Darstellung der Laborperformance bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben. Die Markierung zeigt den Cut-Off von 21 (70 %) der 30 eingesetzten Larven.

3.2.4 Ringversuch Teil IV

Insgesamt nahmen 12 deutsche Laboratorien aus 8 Bundesländern (Sachsen, Sachsen-Anhalt, Berlin, Thüringen, Brandenburg, Niedersachsen, Schleswig-Holstein, Bayern) am Ringversuch teil.

3.2.4.1 Qualitative Auswertung

Alle Teilnehmer führten die AMT gemäß der mitgelieferten SOP durch. Bei 16,6% aller Teilnehmer erfolgte die Auswertung der Proben mit einem Stereomikroskop. 84,4% der Teilnehmer benutzten ein Trichinoskop. Die durchschnittliche Anzahl der gefundenen Larven unterschied sich bei den eingesetzten Auswertungsmethoden nicht.

Von den zu bewertenden 48 DME-positiven Proben wurden Larven in 48 Proben (100 %) gefunden. Kein Ergebnis erwies sich als falsch-negativ. Von den 24 negativen Proben wurden 26 (100 %) korrekt und keine Probe als falsch-positiv beurteilt. Die qualitativen Ergebnisse sind in der Abb. 29 graphisch dargestellt.

3.2.4.2 Quantitative Auswertung

Insgesamt 10 (20,8%) der 48 positiven Proben wurden von den Ringversuchsteilnehmern korrekt ausgezählt. 20 weitere Proben (41,6%) wiesen eine fehlende Larve auf, bei elf Proben wurden zwei Larven übersehen. Die weitere Aufschlüsselung der Fehlerhäufigkeiten ist der Abbildung 30 zu entnehmen.

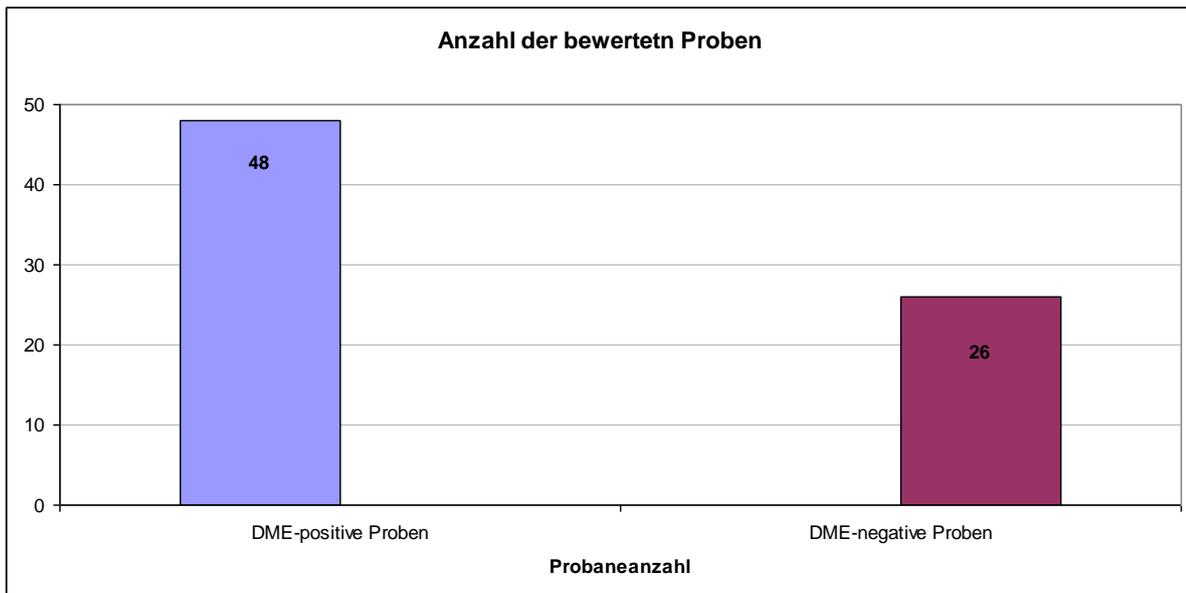


Abbildung 29: Ergebnis der qualitativen Auswertung der im Rahmen des Ringversuches an die Teilnehmer versendeten Proben

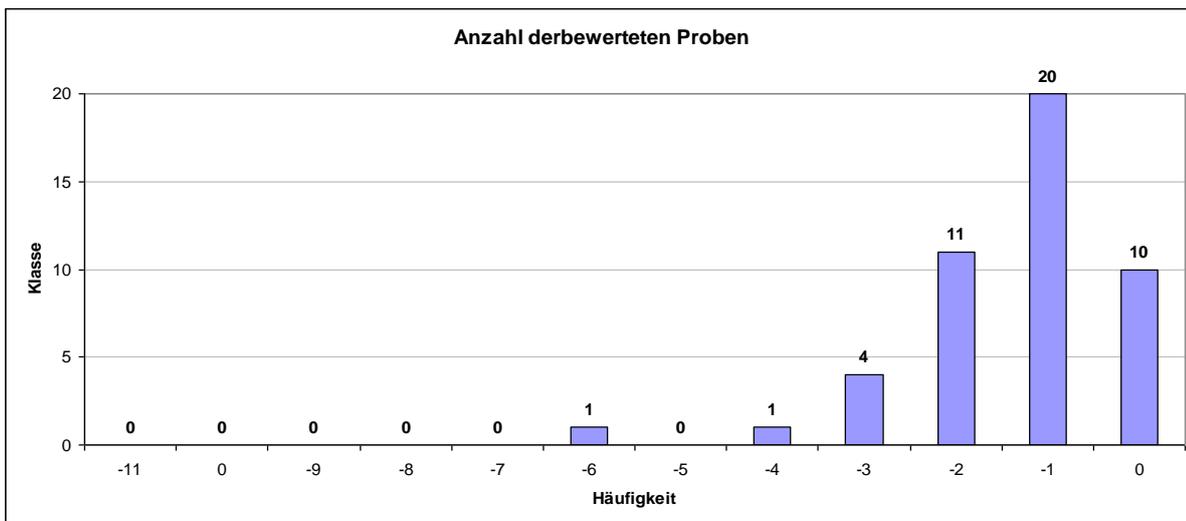


Abbildung 30: Aufschlüsselung der Fehlerhäufigkeiten (Abweichung von Larven-Sollwert) bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung für die einzelnen Labore zeigen, dass kein Teilnehmer alle positiven Proben gleichzeitig qualitativ und quantitativ richtig bewertet hat. Ein Teilnehmer hat nur bei einer Probe eine Larve übersehen und konnte so insgesamt 29 (96,7 %) der 30 der eingesetzten Larven identifizieren. Vier weitere Teilnehmer fanden mehr als 26 (86,67%) der Larven. Insgesamt bewegten sich die Detektionsraten in den positiven Proben zwischen 20 (83,67 %) und 29 (96,7%) DME.

Nach einem allgemeinen Richtwert sollten mindestens 70 % aller in die Fleischklopse verbrachter Larven identifiziert werden. Die Gesamtzahl aller Larven in den vier positiven Proben lag bei 30 Larven. Zehn (83,33%) der 12 in die Auswertung einbezogenen Laboratorien konnten $\geq 70\%$ der in den Proben befindlichen Larven sicher identifizieren. Die Abbildungen 31 und 32 zeigen die Ergebnisse der quantitativen Analyse aufgeschlüsselt nach Laboratorien und Larven Sollwert.

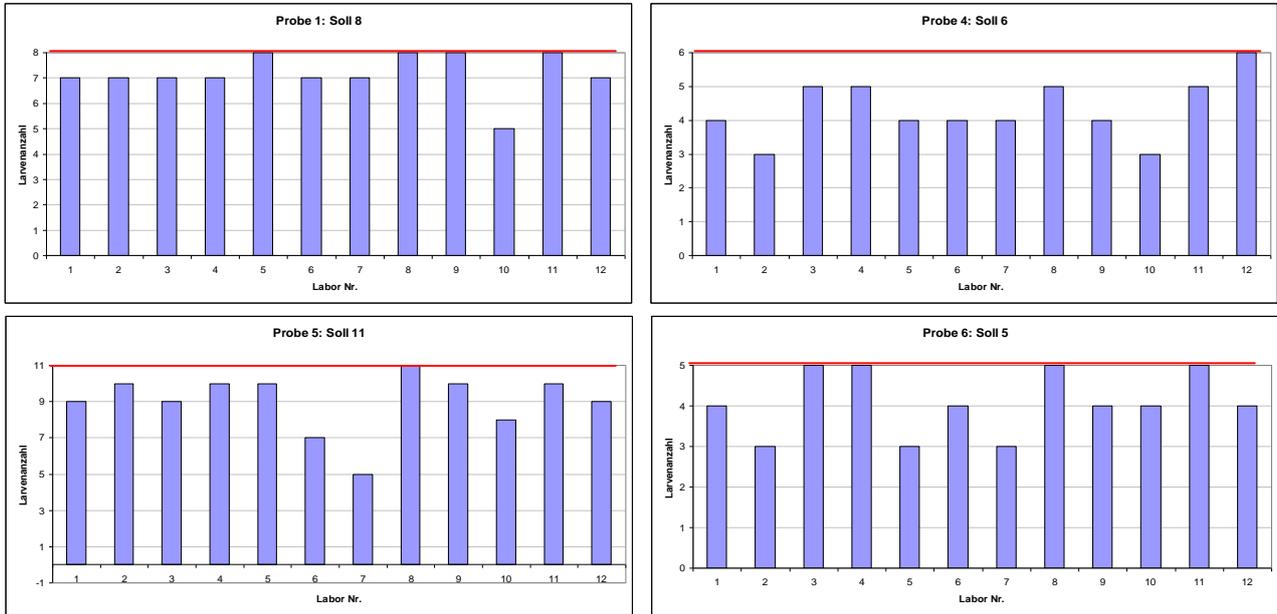


Abbildung 31: Abweichung der Ringversuchsteilnehmer vom Larven-Sollwert bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben

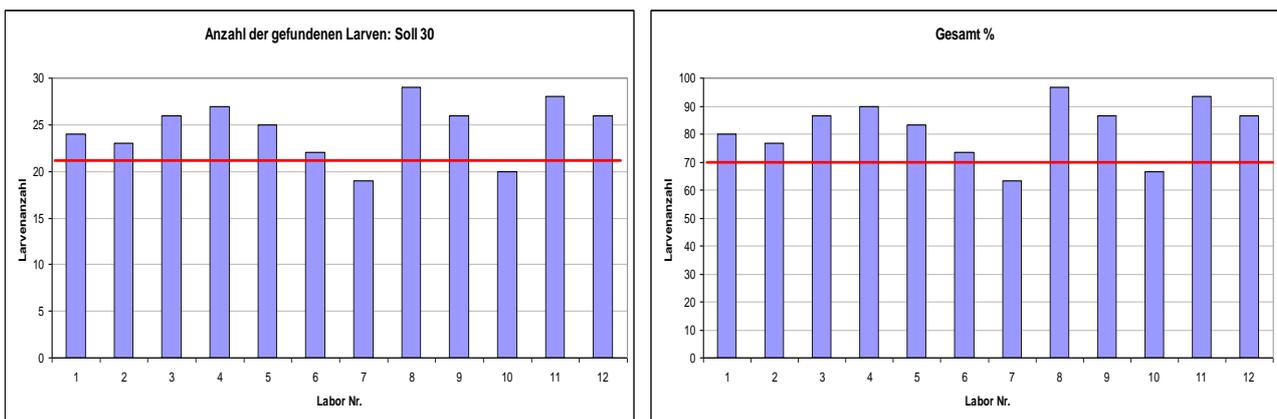


Abbildung 32: Zusammenfassende Darstellung der Laborperformance bei der quantitativen Auswertung der Ringversuchsproben. Die Markierung zeigt den Cut-Off von 21 (70 %) der 30 eingesetzten Larven.

3.3 Prävalenz

Im Institut für Lebensmittelhygiene seit dem Abschlussbericht 28.07.2010 des letzten Projektes (2808HS012) bis zum 18.02.2013 insgesamt 167 weitere Wildschweinkarkassen untersucht.

Die Tiere stammten aus drei verschiedenen Bundesländern (Sachsenanhalt 80 Tiere, Brandenburg 60 Tiere und Sachsen 27 Tiere). Tabelle 5 listet Herkunft, Geschlecht, Gewicht und vorberichtetes Untersuchungsergebnis auf.

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) oder Flusslandschaften (z. B. Salzlandkreis, Cottbus, Görlitz) gekennzeichnet sind. Verbunden mit dem zahlreichen Auftreten geeigneter Endwirte kann hier ein durch das Vorhandensein entsprechender Habitats 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 5). Besonders Waschbären und Dachse aus Brandenburg scheinen häufig Träger der Parasiten zu sein. In Wildgeflügel konnte der Parasit hingegen nicht nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von 167 Wildschweinen mit Hilfe der neu entwickelten Methode der *Alaria alata mesocercariae migration technique* (AMT), zeigten alle gefundenen Larven das für sie typische Bewegungsmuster und waren daher schnell und eindeutig zu identifizieren.

Tabelle 5: An das Institut für Lebensmittelhygiene überstellte Wildschweine:

Lauf. Nr.	Interne Bezeichnung	Gewicht	Geschlecht	VB/US	Herkunft
1	WS 92	27 kg	m	p/n	Uckermark
2	WS 93	31 kg	w	p/n	Uckermark
3	WS 94	35 kg	w	p/p	Görlitz
4	WS 95	k. A.	k. A.	p/p	Görlitz
5	WS 96	30 kg	m	p/n	Görlitz
6	WS 97	42 kg	m	p/n	Görlitz
7	WS 98	13 kg	w	p/n	Görlitz
8	WS 99	k. A.	k. A.	p/n	Görlitz
9	WS 100	25 kg	w	p/p	Görlitz
10	WS 101	k. A.	k. A.	p/p	Görlitz
11	WS 102	18 kg	w	p/p	Salzlandkreis
12	WS 103	k. A.	k. A.	p/p	Magdeburg
13	WS 104	7 kg	m	p/n	Brandenburg
14	WS 105	50 kg	m	p/p	Brandenburg
15	WS 106	20 kg	k. A.	p/p	Magdeburg
16	WS 107	55 kg	w	p/p	Magdeburg
17	WS 108	15 kg	m	p/p	Brandenburg
18	WS 109	14 kg	w	p/p	Salzlandkreis
19	WS 110	48,5 kg	w	p/p	Salzlandkreis
20	WS 111	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis
21	WS 112	k. A.	m	p/p	Salzlandkreis
22	WS 113	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis
23	WS 114	36 kg	m	p/p	Salzlandkreis
24	WS 115	68 kg	m	p/p	Brandenburg
25	WS 116	60 kg	w	p/p	Brandenburg
26	WS 117	65 kg	w	p/p	Brandenburg
27	WS 118	20 kg	m	p/p	Brandenburg
28	WS 119	k. A.	k. A.	?/n	Brandenburg
29	WS 120	k. A.	k. A.	p/p	Schönebeck
30	WS 121	55 kg	m	p/p	Schlachth.Kasel-Golzig
31	WS 122	42 kg	w	p/n	Magdeburg
32	WS 123	30 kg	w	p/p	Salzlandkreis
33	WS 124	35 kg	m	p/p	Salzlandkreis
34	WS 125	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis
35	WS 126	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis
36	WS 127	35 kg	m	p/p	Schönebeck
37	WS 128	30 kg	w	p/n	Schönebeck
38	WS 129	35 kg	w	p/?	Seelensdorf
39	WS 130	37 kg	m	p/?	Seelensdorf
40	WS 131	67 kg	w	p/?	Seelensdorf
41	WS 132	36 kg	w	p/?	Seelensdorf
42	WS 133	25 kg	m	p/p	Salzlandkreis / Lödderitz
43	WS 134	45 kg	m	p/n	Frankfurt/Oder
44	WS 135	55 kg	w	p/n	Salzlandkreis / Calbe
45	WS 136	20 kg	w	p/n	Salzlandkreis / Bründel
46	WS 137	55 kg	w	p/n	Salzlandkreis /Lödderitz
47	WS 138	15 kg	m	p/n	Brandenburg
48	WS 139	25 kg	m	p/n	Brandenburg
49	WS 140	70 kg	w	p/p	Brandenburg
50	WS 141	20 kg	w	p/n	Brandenburg
51	WS 142	20 kg	m	p/n	Brandenburg
52	WS 143	20 kg	w	p/p	Brandenburg
53	WS 144	20 kg	w	p/p	Brandenburg

54	WS 145	19 kg	w	p/p	Brandenburg
55	WS 146	15 kg	m	p/p	Brandenburg
56	WS 147	40 kg	w	p/n	Salzlandkreis / Schönebeck
57	WS 148	35 kg	w	p/p	Salzlandkreis / Schönebeck
58	WS 149	25 kg	w	p/n	Salzlandkreis / Schönebeck
59	WS 150	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis / Bernburg
60	WS 151	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis / Bernburg
61	WS 152	24 kg	m	p/p	Salzlandkreis / Bernburg
62	WS 153	39 kg	m	p/n	Brandenburg
63	WS 154	56 kg	w	p/p	Brandenburg
64	WS 155	18 kg	w	p/p	Salzlandkreis / Schönebeck
65	WS 156	42 kg	w	p/p	Brandenburg
66	WS 157	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis / Schönebeck
67	WS 158	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis / Klosterlenin
68	WS 159	22 kg	w	p/p	Salzlandkreis / Plötzki
69	WS 160	25 kg	m	p/n	Brandenburg
70	WS 161	29 kg	m	p/p	Brandenburg
71	WS 162	k. A.	k. A.	p/n	Salzlandkreis / Nienburg
72	WS 163	k. A.	k. A.	p/p	Görlitz
73	WS 164	15 kg	m	p/p	Schönebeck/ Pretzien
74	WS 165	30 kg	w	p/p	Schönebeck/ Pretzien
75	WS 166	33 kg	m	p/p	Schönebeck/ Pretzien
76	WS 167	26 kg	m	p/p	Schönebeck/ Pretzien
77	WS 168	k. A.	k. A.	p/n	Schlachth.Kasel/ Golzig
78	WS 169	23 kg	m	p/p	Brandenburg
79	WS 170	24 kg	w	p/p	Brandenburg
80	WS 171	25 kg	w	p/p	Brandenburg
81	WS 172	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis / Lödderitz
82	WS 173	27 kg	w	p/p	Salzlandkreis / Bernburg
83	WS 174	33 kg	w	p/p	Salzlandkreis / Randau
84	WS 175	34 kg	w	p/p	Schlachth.Kasel/ Golzig
85	WS 176	60 kg	w	p/p	Schlachth.Kasel/ Golzig
86	WS 177	k. A.	k. A.	p/p	Schönebeck
87	WS 178	k. A.	k. A.	p/p	Postdam
88	WS 179	30 kg	w	p/p	LK Dahme-Spreewald
89	WS 180	43 kg	w	p/p	LK Dahme-Spreewald
90	WS 181	24 kg	m	p/p	LK Dahme-Spreewald
91	WS 182	k. A.	k. A.	p/p	Calbe/ Saale
92	WS 183	20 kg	w	p/p	Brandenburg
93	WS 184	k. A.	k. A.	p/p	Schlachth.Kasel/ Golzig
94	WS 185	14 kg	m	p/n	Salzlandkreis / Bernburg
95	WS 186	29 kg	m	p/p	Schönebeck
96	WS 187	21 kg	m	p/p	Potsdam/ Mittelmark
97	WS 188	k. A.	k. A.	p/n	Salzlandkreis / Bernburg
98	WS 189	30 kg	w	p/p	Salzlandkreis /Schönebeck
99	WS 190	65 kg	w	n/n	Marbach/Mittelsachsen
100	WS 191	55 kg	m	negativ	Salzlandkreis /Schönebeck
101	WS 192	k. A.	k. A.	p/n	Salzlandkreis /Schönebeck
102	WS 193	15 kg	w	p/p	Bautzen/ Görlitz
103	WS 194	45 kg	m	p/p	Rietzschen/ Görlitz
104	WS 195	k. A.	k. A.	?/n	Brandenburg
105	WS 196	k. A.	k. A.	p/p	Weissenfels
106	WS 197	17 kg	w	p/p	Weissenfels
107	WS 198	44 kg	w	p/p	Weissenfels
108	WS 199	20 kg	w	p/p	Weissenfels
109	WS 200	21 kg	m	p/p	Weissenfels

110	WS 201	10 kg	m	p/p	Weissenfels
111	WS 202	k. A.	k. A.	p/p	Weissenfels
112	WS 203	20 kg	w	p/p	Weissenfels
113	WS 204	25 kg	w	p/p	Weissenfels
114	WS 205	65 kg	w	p/p	Weissenfels
115	WS 206	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis
116	WS 207	14 kg	m	p/p	Salzlandkreis
117	WS 208	29 kg	m	p/p	Salzlandkreis
118	WS 209	24 kg	w	p/p	Brandenburg
119	WS 210	19 kg	w	p/p	Brandenburg
120	WS 211	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis
121	WS 212	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis
122	WS 213	23 kg	m	p/p	Luckau
123	WS 214	76 kg	m	p/p	Luckau
124	WS 215	28 kg	m	p/p	Salzlandkreis
125	WS 216	k. A.	k. A.	p/p	Salzlandkreis
126	WS 217	51 kg	w	p/p	Salzlandkreis
127	WS 218	k. A.	k. A.	p/p	v
128	WS 219	55 kg	w	p/p	Salzlandkreis / Lödderitz
129	WS 220	30 kg	m	p/p	Brandenburg
130	WS 221	26 kg	w	p/p	Görlitz
131	WS 222	22 kg	m	p/p	Görlitz
132	WS 223	24 kg	m	p/p	LK Görlitz
133	WS 224	28 kg	m	p/p	Schönebeck
134	WS 225	30 kg	w	p/p	Schönebeck
135	WS 226	k. A.	w	p/?	Schönebeck
136	WS 227	k. A.	k. A.	p/p	Löbau
137	WS 228	10 kg	m	p/?	Schönebeck
138	WS 229	33 kg	w	p/?	Brandenburg
139	WS 230	41 kg	w	p/?	Brandenburg
140	WS 231	21 kg	w	p/p	Löbau
141	WS 232	25 kg	m	p/p	Löbau
142	WS 233	45 kg	m	p/p	LK Görlitz
143	WS 234	25 kg	w	p/p	Schönebeck
144	WS 235	30 kg	m	p/p	Potsdam/Mittelmark
145	WS 236	31 kg	w	p/p	Löbau
146	WS 237	23 kg	m	p/p	Potsdam/Mittelmark
147	WS 238	34 kg	w	p/p	Potsdam/Mittelmark
148	WS 239	45 kg	w	p/p	Potsdam/Mittelmark
149	WS 240	k. A.	k. A.	p/p	Potsdam/Mittelmark
150	WS 241	16 kg	m	p/n	Potsdam/Mittelmark
151	WS 242	20 kg	m	p/n	Löbau
152	WS 243	k. A.	k. A.	p/p	LK Görlitz
153	WS 244	22 kg	w	p/n	Brandenburg
154	WS 245	k. A.	k. A.	p/n	Brandenburg
155	WS 246	Frischling	k. A.	p/p	Potsdam/Mittelmark
156	WS 247	50 kg	m	p/p	Potsdam/Mittelmark
157	WS 249	k. A.	k. A.	p/p	LK Görlitz
158	WS 250	15 kg	k. A.	p/p	Schönebeck
159	WS 251	60 kg	w	p/p	Brandenburg
160	WS 252	46 kg	w	?/n	Leipzig
161	WS 253		w		Schönebeck
162	WS 254	44 kg	k. A.	?/n	Schönebeck
163	WS 255	k. A.	m		Veterinäramt Löbau
164	WS 256	30 kg	k. A.	p/p	Falkenhain/ Wurzen

165	WS 257	k. A.	w	p/p	Calbe /Saale
166	WS 258	11 kg	k. A.	p/p	Calbe /Saale
167	WS 259	21 kg	w	p/p	Calbe /Saale

WS: Wildschwein; VB: Vorbericht DME; k. A.: keine Angabe; n. u.: nicht untersucht; p: positiv; n: negativ; w: weiblich; m: männlich; LK: Landkreis

Weitere Ergebnisse

Im Folgenden werden zusätzlich zu den im Forschungsbericht primär bearbeiteten Zielen weitere Ergebnisse aufgelistet, die als Nebenprodukt unserer Untersuchungen hinsichtlich der Prävalenz von *Alaria* Mesozerkarien betrachtet werden können. Tabelle 6 und 7 geben dabei einen Überblick über andere Wildtierspezies, die im Rahmen des Forschungsprojektes auf *Alaria alata* untersucht wurden.

Tabelle 6: Nachweis von *Alaria alata* Entwicklungsstadien in Waschbären

Tier-Nr.	VB/US	Herkunft
Waschbär 1	p/p	Brandenburg
Waschbär 2	p/p	Brandenburg
Waschbär 3	p/p	Brandenburg
Waschbär 4	p/p	Brandenburg
Waschbär 5	p/p	Brandenburg
Waschbär 6	p/p	Salzlandkreis
Waschbär 7	p/p	Brandenburg
Waschbär 8	p/p	Salzlandkreis
Waschbär 9	p/p	Salzlandkreis
Waschbär 10	n/n	Brandenburg
Waschbär 11	n/n	SLK/ Schönebeck
Waschbär 12	p/p	Brandenburg
Waschbär 13	p/p	Brandenburg
Waschbär 14	p/p	Brandenburg
Waschbär 15	p/p	Brandenburg
Waschbär 16	p/p	Brandenburg
Waschbär 17	p/p	Brandenburg
Waschbär 18	p/p	Brandenburg
Waschbär 19	p/p	Brandenburg
Waschbär 20	p/p	Brandenburg
Waschbär 21	n/n	Brandenburg
Waschbär 22	n/n	Brandenburg
Waschbär 23	n/n	Brandenburg
Waschbär 24	p/p	Brandenburg
Waschbär 25	p/p	Brandenburg
Waschbär 26	n/n	Leipzig

Waschbär 27	n/n	Leipzig
Waschbär 28	n/n	Leipzig
Waschbär 29	n/n	Leipzig
Waschbär 30	n/n	Leipzig
Waschbär 31	n/n	Leipzig
Waschbär 32	n/n	Leipzig
Waschbär 33	n/n	Leipzig
Waschbär 34	n/n	Leipzig
Waschbär 35	n/n	Leipzig
Waschbär 36	n/n	Leipzig
Waschbär 37	n/n	Leipzig
Waschbär 38	p/p	Brandenburg
Waschbär 39	p/p	Brandenburg
Waschbär 40	n/n	Leipzig
Waschbär 41	n/n	Leipzig
Waschbär 42	n/n	Leipzig
Waschbär 43	n/n	Leipzig
Waschbär 44	n/n	Leipzig
Waschbär 45	n/n	Leipzig
Waschbär 46	n/n	Leipzig
Waschbär 47	p/p	Leipzig
Waschbär 48	n/n	Leipzig
Waschbär 49	n/n	Leipzig
Waschbär 50	p/p	Leipzig
Waschbär 51	n/n	Leipzig
Waschbär 52	n/n	Leipzig
Waschbär 53	n/n	Leipzig
Waschbär 54	n/n	Leipzig
Waschbär 55	n/n	Leipzig
Waschbär 56	n/n	Leipzig
Waschbär 57	n/n	Leipzig
Waschbär 58	n/n	Leipzig
Waschbär 59	n/n	Leipzig
Waschbär 60	n/n	Leipzig
Waschbär 61	n/n	Leipzig
Waschbär 62	n/n	Leipzig

Waschbär 63	p/p	Leipzig
Waschbär 64	n/n	Leipzig

VB: Vorbericht DME; k. A.: keine Angabe; n. u.: nicht untersucht; p: positiv; n: negativ

Tabelle 7: Nachweis von *Alaria alata* Entwicklungsstadien in verschiedenen Wildtieren

Tierart	VB/US	Herkunft
Amsel	n/n	Leipzig
Bleßralle	n/n	Brandenburg
Buntspecht	n/n	Brandenburg
Dachs	p/p	Brandenburg
Dachs	p/p	Magdeburg
Dachs	n/n	Brandenburg
Dachs	n/n	Brandenburg
Dachs	n/n	Brandenburg
Dachs	n/p	Brandenburg
Dachs	p/p	Brandenburg
Dachs	p/p	Brandenburg
Eule	n/n	Brandenburg
Fuchs 1	p/p	Salzlandkreis
Fuchs 2	p/p	Salzlandkreis
Kröte 1	n/n	Nordsachsen
Kröte 2	n/n	Nordsachsen
Kröte 3	n/n	Nordsachsen
Kröte 4	n/n	Nordsachsen
Kröte 5	n/n	Nordsachsen
Kröte 6	n/n	Nordsachsen
Kröte 7	n/n	Essen
Kröte 8	n/n	Essen
Kröte 9	n/n	Essen
Kröte 10	n/n	Essen
Kröte 11	n/n	Essen
Kröte 12	n/n	Essen
Kröte 13	n/n	Essen
Kröte 14	n/n	Essen
Kröte 15	n/n	Essen
Kröte 16	n/n	Essen
Kröte 17	n/n	Essen
Kröte 18	n/n	Essen
Kröte 19	n/n	Essen
Kröte 20	n/n	Essen
Marderhund	n/n	Glesien
Marderhund	p/p	Brandenburg
Marderhund	p/p	Brandenburg
Marderhund	n/n	Brandenburg
Marderhund	n/n	Brandenburg
Marderhund	p/p	Brandenburg
Möwe 1	n/n	Brandenburg
Möwe 2	n/n	Brandenburg
Reiher	n/n	Brandenburg
Sperber 1	n/n	Brandenburg
Wildente	n/n	SLK/ Schönebeck

VB: Vorbericht DME; k. A.: keine Angabe; n. u.: nicht untersucht; p: positiv; n: negativ

3.3.1 Untersuchungen zur Verteilung des DME im Wildschwein

Insgesamt wurden 167 vorberichtlich auf DME positiven Wildschweinen untersucht. Davon wurden die Daten von 142 (Tabelle 8) Tieren hinsichtlich der Verteilung der DME ausgewertet. Bei der Körperregion Zwerchfellpfeiler konnten bei 87(61,27%) Tieren DME nachgewiesen werden und war damit das am häufigsten positiven Gewebe. Die am seltensten positiven Gewebe war die Kaumuskulatur (*Mm masseter, temporalis, pterygoideus* lat.) nur 38(26,76%) positive Tieren. Die restlichen 5 Gewebe (Abbildung 34) wurden zwischen 44(30,99%) und 75 (52,82%) Tieren DME nachgewiesen.

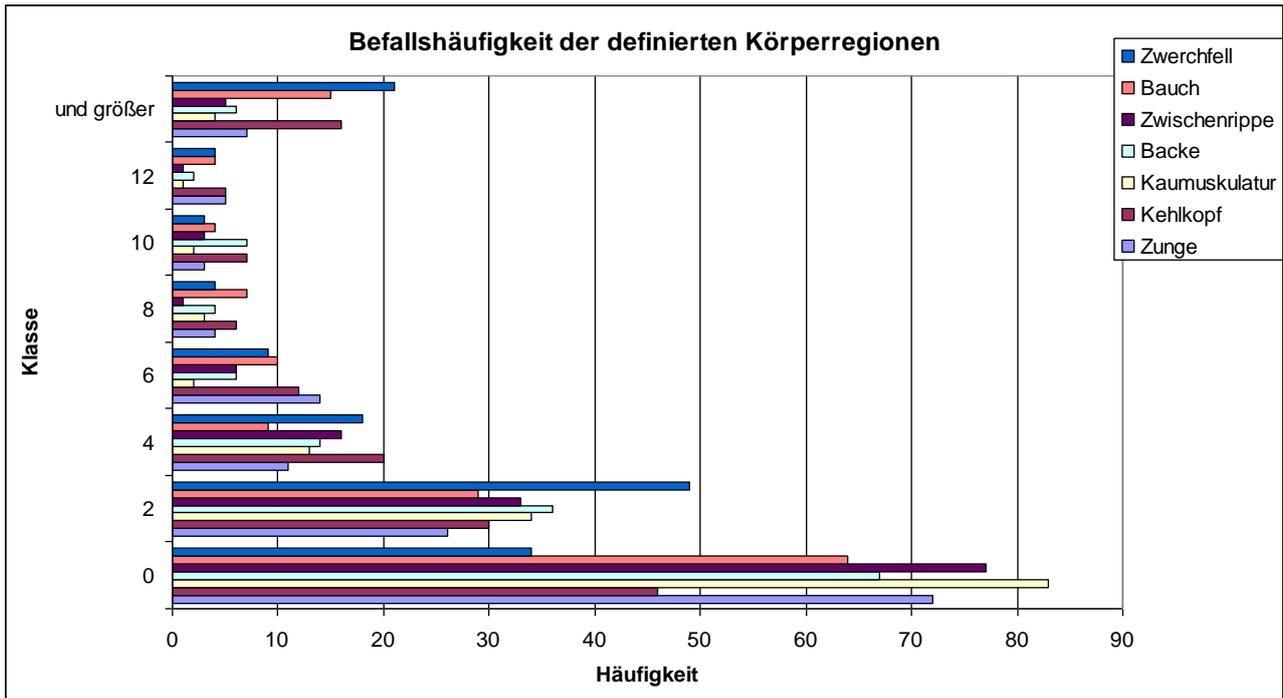


Abbildung 33: Befallshäufigkeit der definierten Körperregionen im Wildschwein bei 142 untersuchten Tieren

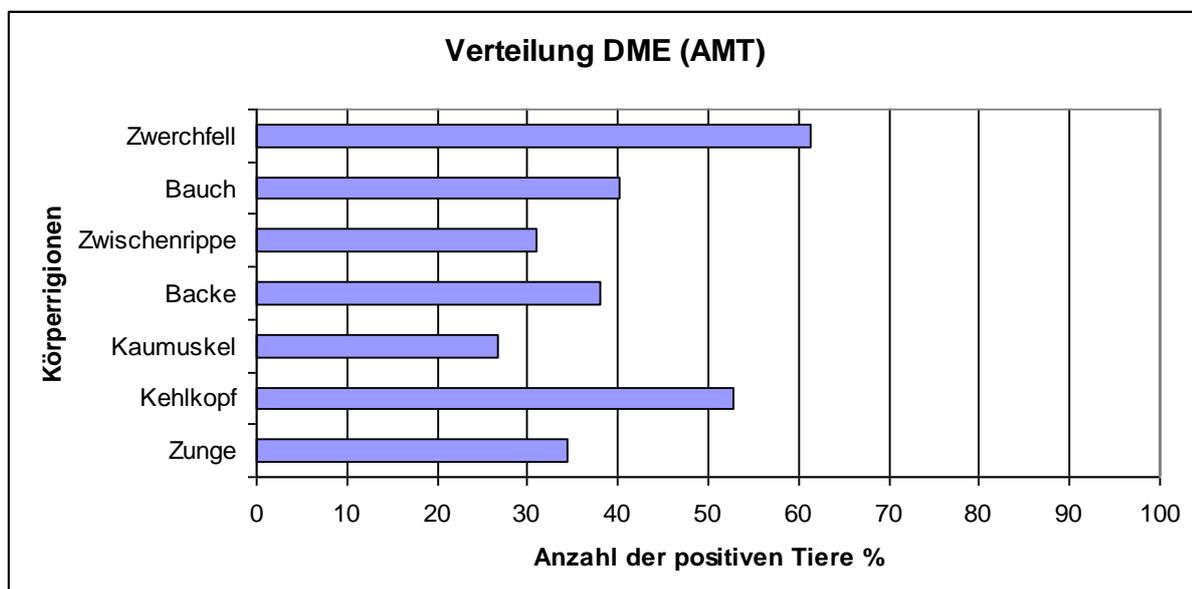


Abbildung 34: Befallshäufigkeit der definierten Körperregionen im Wildschwein bei 142 untersuchten Tieren, Anzahl positiver Tiere in Prozent

Mit 6,02 Larven in 30 g war das Gewebe der Zwerchfellpfeiler das am stärksten befallene Gewebe (siehe Tabelle x und Abbildung x). Darauf folgten mit 5,73 Larven/30 g der Kehlkopf und mit 4,45 Larven/30 g das Bauchfell. Die Ergebnisse der Untersuchung der weiteren Gewebe sind in der Tabelle 8 und den Abbildung 33 und 35 aufgeführt.

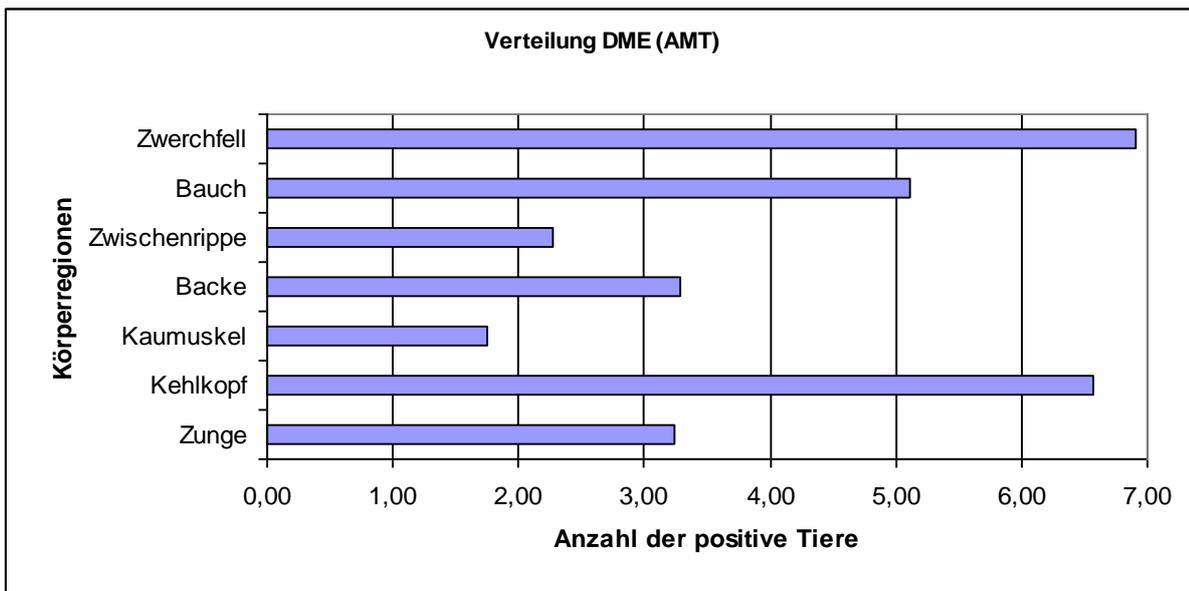


Abbildung 35: Befallsstärke der definierten Körperregionen im Wildschwein bei 142 untersuchten Tieren, Larven in 30 g Gewebe

Tabelle 8: Verteilung des DME im Wildschwein

Luaf.-Nr.	Wildschwein Nr.	Zunge	Kehlkopf	Kaumuskel	Backe	Zwischenrippe	Bauch	Zwerchfell
1	91	0	0	0	0	0	1	1
2	94	0	5	0	0	0	0	4
3	95	0	2	0	2	1	0	3
4	96	0	0	0	0	0	0	2
5	97	0	0	0	0	0	0	1
6	98	0	0	0	0	0	0	5
7	99	0	0	0	0	0	0	2
8	100	0	1	0	0	0	0	2
9	101	1	5	0	0	0	0	3
10	102	3	12	6	1	17	9	15
11	103	4	4	4	0	1	2	2
12	105	2	0	0	2	0	1	1
13	106	1	0	0	0	0	0	0
14	107	6	2	7	2	0	2	5
15	108	12	4	30	8	2	6	9
16	109	0	0	0	0	5	6	15
17	110	12	3	0	15	2	13	0
18	111	0	1	1	0	0	1	3
19	112	0	4	0	0	0	0	2
20	113	5	4	4	3	4	0	2
21	114	6	3	0	3	0	1	3
22	115	0	5	1	2	2	2	2
23	116	0	0	0	0	0	1	0
24	117	0	4	0	1	0	0	1
25	118	1	2	1	0	1	0	0
26	120	1	2	2	0	0	0	6
27	121	0	2	1	2	1	14	11
28	122	0	2	0	0	0	0	2
29	123	2	8	6	3	1	10	3
30	124	1	0	1	1	0	0	2
31	125	1	4	1	2	1	0	2
32	126	1	0	4	0	0	0	0
33	127	6	59	25	50	1	2	8
34	133	5	8	24	13	6	4	26
35	138	0	2	0	0	0	0	3
36	139	0	0	0	0	0	0	4
37	140	4	8	3	1	1	7	2
38	143	0	0	1	0	0	0	0
39	144	0	2	2	2	0	0	0
40	145	0	1	0	0	0	0	0
41	146	0	1	1	0	0	0	0
42	147	0	0	0	0	0	0	3
43	148	1	3	0	1	0	0	2
44	149	0	0	0	0	0	0	1
45	150	4	1	0	0	0	2	0
46	151	0	24	0	2	0	12	25
47	152	1	1	0	0	0	0	2
48	154	3	10	3	1	6	4	8
49	155	8	5	0	5	10	1	3
50	156	0	9	0	0	1	1	2
51	157	0	0	1	1	0	0	2

52	158	12	15	0	8	4	23	87
53	159	6	6	1	4	3	0	8
54	160	0	0	0	0	0	0	2
55	161	1	1	0	0	0	0	2
56	163	0	0	0	0	1	0	0
57	164	1	10	0	0	0	1	2
58	165	0	0	0	2	0	1	0
59	166	0	2	0	0	0	0	1
60	167	1	0	0	0	3	15	15
61	169	20	56	11	16	1	20	22
62	170	0	0	3	2	0	0	5
63	171	15	2	7	0	0	13	4
64	172	0	12	2	1	0	6	3
65	173	0	7	0	2	0	4	5
66	174	3	16	0	4	0	3	0
67	175	0	0	0	0	0	1	0
68	176	0	3	0	1	1	6	0
69	177	2	3	1	1	2	10	21
70	178	0	21	0	9	0	5	8
71	179	0	0	0	11	22	43	27
72	180	5	2	0	1	4	6	11
73	181	12	14	0	12	52	12	45
74	182	0	6	1	0	1	2	0
75	183	0	0	0	0	3	1	0
76	184	5	5	0	8	1	0	2
77	185	0	4	0	0	0	0	3
78	186	1	16	2	10	3	7	2
79	187	0	2	0	0	0	0	0
80	189	0	0	0	0	3	0	0
81	190	0	3	0	0	0	0	1
82	191	2	0	0	0	1	0	1
83	192	0	1	0	1	0	0	2
84	193	0	0	0	0	0	0	1
85	194	0	41	1	10	4	3	9
86	196	18	15	0	0	0	15	100
87	197	5	9	10	3	4	5	18
88	198	8	20	0	9	6	8	12
89	199	18	19	3	10	30	30	35
90	200	21	12	1	7	0	8	3
91	201	0	0	3	0	0	0	10
92	202	0	1	2	4	0	0	0
93	203	0	0	0	0	2	0	13
94	204	0	0	0	0	12	0	0
95	205	2	11	9	2	3	8	2
96	206	9	5	2	2	0	1	0
97	207	2	6	1	9	8	30	12
98	208	1	0	1	0	2	1	1
99	209	8	0	0	0	1	0	2
100	210	0	1	0	0	0	0	0
101	211	7	4	2	3	0	1	1
102	212	14	12	2	2	0	0	1
103	213	0	0	0	0	3	28	17
104	214	9	41	4	3	10	13	3
105	215	0	0	0	1	1	1	2
106	216	0	0	0	0	1	0	0

107	217	4	3	0	0	0	0	0
108	218	4	7	0	0	6	1	2
109	219	0	0	0	0	2	1	16
110	220	0	0	1	4	1	7	4
111	221	5	1	1	1	0	0	1
112	222	5	2	0	0	0	1	4
113	223	0	0	0	0	0	1	0
114	224	3	4	3	0	1	1	1
115	225	0	1	0	2	0	0	2
116	226	0	3	0	0	0	1	2
117	227	4	50	15	10	20	10	70
118	228	0	8	0	3	5	0	4
119	231	2	5	4	6	1	4	26
120	232	0	3	3	1	0	0	0
121	233	0	0	0	0	0	0	2
122	234	1	4	2	2	2	3	0
123	235	5	2	1	0	0	6	2
124	236	1	2	1	3	9	12	0
125	237	1	9	2	4	4	3	5
126	238	0	0	0	0	1	0	1
127	239	10	4	8	6	4	12	2
128	240	5	9	0	2	1	6	6
129	243	2	10	2	3	0	17	25
130	246	0	0	2	5	0	0	5
131	247	0	0	0	1	0	0	0
132	248	1	2	0	0	0	0	1
133	249	0	0	2	2	0	2	0
134	250	0	0	0	0	2	3	1
135	251	0	25	0	1	0	2	0
136	253 A	0	5	0	5	0	6	1
137	255	6	1	0	5	0	0	0
138	256	0	0	0	0	0	0	2
139	257	86	150	1	45	3	164	6
140	258	0	1	0	0	0	0	0
141	259	4	0	3	72	4	21	52
142	253 B	12	6	0	2	1	8	18

3.4 Tenazität

3.4.1 Wildschwein- / Waschbar-Schinken

Insgesamt wurden 19 Schinken im Rahmen der Versuchsreihe hergestellt. Nach der Bearbeitung lag das Gewicht der Schinken zwischen 150 und 300g. Der pH-Wert lag dabei zwischen 5,3 und 5,6. Abbildung 36 zeigt getrocknete Wildschweinfleischstücke (Variante 1- Schinken 1). In Abbildung 37 sind gesalzene Schinken aus Waschbärenfleisch abgebildet (Variante 2). Die Ergebnisse der Studien zeigen, dass *A. alata* Mesozerkarien in behandeltem Wildschwein- und Waschbärenfleisch durch Salz abgetötet werden. Die Ergebnisse zeigen des Weiteren, dass keine Larven in den Produkten überleben konnten (Tabelle 9 und 10). Dabei ist ein Zusammenhang zwischen dem Stoffwechsel der Parasiten und der Umgebungstemperatur erkennbar. Beim Anstieg der Temperatur erhöht sich die Aktivität des Parasiten und infolgedessen erhöht sich der toxische Effekt des Salzes (ZIMMERMAN 1971). RANSOM, SCHWARTZ und RAFFENSPERGER (1920) zeigten, dass die Wirksamkeit des Behandlungsprozesses zur Inaktivierung von Trichinenlarven von der gewählten Salzkonzentration, der Temperatur und von der Zeit abhängig ist. Des Weiteren wurde festgestellt, dass Salz allein wirksam gegen *Trichinella spp.* in Fleisch oder Hackfleisch war. Diese Behandlung ist jedoch unpraktisch, da sie lange Zeit in Anspruch nimmt, um die Parasiten zu inaktivieren (ZIMMERMAN 1971). RANSOM, SCHWARTZ und RAFFENSPERGER (1920) stellten fest, dass Salz als ein wichtiger Faktor bei der Devitalisierung der Parasiten darstellt. Der Einfluss des a_w -Wertes ist schwer zu beurteilen, da im Rahmen der Trocknung des Schinken Restwasser aus den tieferen, salzarmen Muskeln auf die oberflächlichen Muskeln zu diffundiert. Hierdurch wird die Feuchtigkeit der Muskulatur nahe der Oberfläche erhöht. Zudem sinkt der relative Salzgehalt, wenn der Trocknungsprozess fortschreitet. Die Lebensfähigkeit von *Trichinella* wurde verringert, wenn die Salzlake der getrockneten Muskeln bei ca. 8% lag (ZIMMERMAN 1971). Zusätzlich war die Trocknungstemperatur der entscheidende Faktor für eine sicheres Abtöten von Trichinen. Deshalb empfiehlt ZIMMERMAN (1971) für das sichere Abtöten von *Trichinellen* eine Pökellung über 28 Tage mit einer darauf folgenden Trocknung von 6 Tagen bei 36,6°C.



Abbildung 36: Rohschinken hergestellt aus infiziertem Wildschweinfleisch einen Tag nach der Produktion.



Abbildung 37: Wildschweinschinken am Tag 5 nach Herstellung.

Tabelle 9: Ergebnisse der Überlebensfähigkeit von *A.alata*-Mesozerkarien in Rohschinken aus artifiziiell infiziertem Wildschweinfleisch (Variante 1).

Produktionstag	Verfahrensbeschreibung	Konditionen	Wildschweinschinken Nummer der Proben = 15
1 bis 13	Salzen	18-20°C / 13 Tage	-
14	Salzentfernung		-
15	Lagerung		-
16	Waschen	Wasser	-
16	Reifung (Schinken 1)	26°C / 1 Tag	-
16	Reifung (Schinken 2)	25°C / 24 h Feuchtigkeit 80-85%	-
17	Reifung (Schinken 2)	26°C / 5 Tage	-

--- nicht getestet

(+) positiv: vitale Larven

(-) negativ: tote Larven

Tabelle 10: Ergebnisse der Überlebensfähigkeit von *A.alata*-Mesozerkarien in Rohschinken aus infiziertem Waschbärenfleisch (Variante 2).

Produktionstag	Verfahrensbeschreibung	Konditionen	Waschbärenschinken (n= 4)
1 bis 5	Salzen und Aushärtung	2-3% NCS 18-20°C / 5 days Feuchtigkeit 90%	-
6	Abwaschen und in Wasser getaucht	Wasser 12 Stu	-
7 bis 8	Räuchern	20 °C / 2 Tage Feuchtigkeit 80-85%	-
9 bis 12	Reifung	20-22°C / 3 Tage	-

--- nicht getestet

(+) positiv: vitale Larven

(-) negativ: tote Larven

3.4.2 Wildschwein- und Waschbär-Salami

Bei gereiften Rohwürsten werden durch natürlich vorkommende oder industriell hergestellte Milchsäurebakterien (LAB), Kohlenhydrate zu Milchsäure verstoffwechselt und dadurch die Reifung begünstigt. Diese Starter-/Schutzkulturen sind zum Einen für die gewünschte Aromaentwicklung not-

wendig, zum Anderen wird durch ihre Vorhandensein ein Wachstums unerwünschter, pathogener Mikroorganismen in Lebensmitteln verhindert (METAXOPOULOS et al. 1981).

Die Experimente wurden unter Bedingungen einer traditionellen Herstellung durchgeführt. Als Starterkulturen wurden *Lactobacillus sakei* und *Staphylococcus carnosus* eingesetzt. Der *Lactobacillus* sp. wird routinemäßig für die Reifung von Salamis verwendet. Insgesamt wurden 42 Wildschwein- und Waschbär-Salamis analysiert. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die *A. alata* Mesozerkarien bis zum zweiten Produktionstag aktiv und lebendig waren (Tabelle 11). Es zeigte sich, dass die Herstellung der Milchsäure in den ersten 48 Stunden stabil und vergleichsweise schnell erfolgte (Abbildungen 6, 7, 8). Die Zugabe der kultivierten Starter führte zu einer raschen Reduktion des Ausgangs-pH-Wertes. Ein unmittelbarer Rückgang des pH-Wertes ist damit ein Indikator für den Beginn der Fermentation. Die Herstellung von Salamis endet frühestens nach drei Tagen. Das bedeutet, dass die Larven mit Abschluss des Herstellungsprozesses abgetötet sind. Die Daten zeigen, dass eine natürliche Fermentation ohne Zugabe von Starterkulturen ein sicheres Abtöten von *A. alata* Mesozerkarien nicht gewährleisten kann.



Abbildung 38: Langereifte Rohwürste (Salami) hergestellt aus artifiziert infiziertem Wildschweinfleisch am Tag der Herstellung



Abbildung 39: Langereifte Rohwürste (Salami) hergestellt aus infiziertem Waschbärenfleisch am Tag der Herstellung.



Abbildung 40: Langereifte Rohwürste (Salami) am 5. Tag nach der Herstellung. Links: Waschbärenfleisch. Rechts: Wildschwein.

Tabelle 11: Ergebnisse der Versuch zur Überlebensfähigkeit von *A.alata*-Mesozerkarien in gereiften Rohwürsten (Salami) aus infiziertem Waschbärenfleisch und artifiziell infiziertem Wildschweinfleisch

Herstellungstag	Verfahrensbeschreibung	Konditionen	Wildschweinsalami (n= 19)	Waschbärensalami (n = 23)
1	Produktion	---	---	---
2	Fermentation	23- 25°C/ Feuchtigkeit 88-90%	+	+
3	Reifung	18-19°C/ Feuchtigkeit 75-80%	-	-
4			-	-
5			-	-
6			-	-
7			-	-
8			-	-
9			-	-
10			-	-

--- nicht getestet

(+) positiv: vitale Larven

(-) negativ: tote Larven

3.4.3 Kurzgereifte Rohwürste (Knacker) aus Waschbärenfleisch

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass die Larven bis zu 2 Tagen überleben konnten (Tabelle 12). Hierbei gilt zu berücksichtigen das "Knacker" üblicherweise häufig unmittelbar nach der Herstellung verzehrt werden (Abbildung 41). Auf Grundlage dieser Ergebnisse ergibt sich für kurz gereifte Rohwürste eine potentielle Gesundheitsgefährdung für den Verbraucher durch den Verzehr von infiziertem Ausgangsmaterial.



Abbildung 41: Kurzgereifte Rohwurst "Knacker" aus infiziertem Waschbärfleisch

Tabelle 12: Versuchsergebnisse zur Überlebensfähigkeit von *A.alata*-Mesozerkarien in kurzgereiften Rohwürsten (Knacker) aus infiziertem Waschbärenfleisch

Herstellungstagtag	Arbeitsschritt	Konditionen	Charge 1 DME positiv (n=11)	Charge 2 DME negativ (n=11)
1	Produktion	---	---	--
2	Reifung & Trocknen	16°C/ Feuchtigkeit 75-78%	+	+
3			-	-
4			-	-
5			-	-
6			-	-
7			-	-

--- nicht getestet

(+) positiv: vitale Larven

(-) negativ: tote Larven

3.4.4 Salzkonzentration

Bei Salamis mit einer verwendeten Salzkonzentration von 2,0 % und ausreichenden Trockenzeiten wurden durch die a_w -Wert-Abnahme *T. spiralis spiralis*-Larven zerstört (Smith, Messier & Tittiger 1989). In unseren Versuchen zeigte sich, dass die *Alaria alata*-Larven (n = 96, Dreifachansatz) bis zu 20 Tage in 2 %iger Salzkonzentration überleben konnten (Abbildung 42).

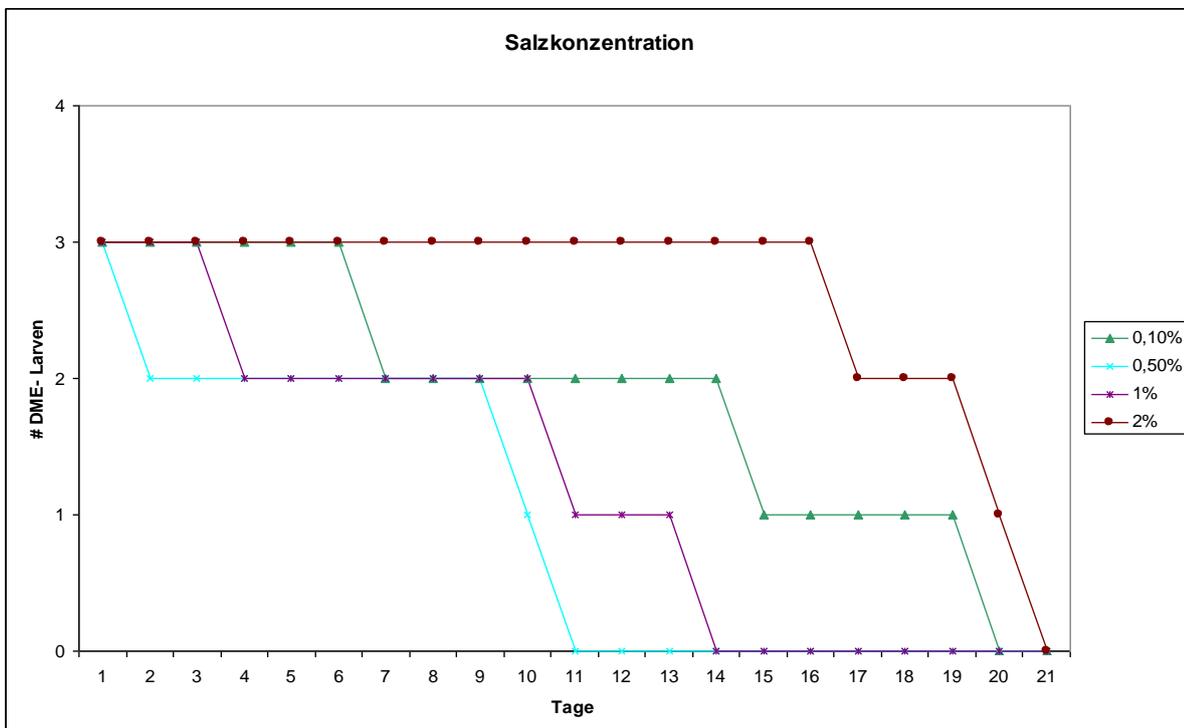


Abbildung 42: Überlebensrate (in Tagen) von *A. alata*-Mesozerkarien in Abhängigkeit von der Salzkonzentrationen

3.4.5 Ethanol-Konzentration

Geeignete Desinfektionsmittel müssen für die Arbeit mit Parasiten zur Verfügung stehen. Verfahren für eine sichere Desinfektion von infiziertem Labormaterial und Inaktivierung der Larven sind notwendig für einen sicheren Umgang mit Lebensmitteln, insbesondere mit Wildfleisch.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass *A. alata* Mesozerkarie (n = 227, Wiederholungen: 8) bis zu 2 Stunden in einer 0,7%igen Ethanollösung überleben (Tabelle 13). Ethanol wurde in dieser Studie bei Raumtemperatur (22 bis 24° C) und einer Einwirkzeit von 2-3 Stunden verwendet. Es kann geschlussfolgert werden, dass übliche Labordesinfektionsmittel wie Ethanol keine tödliche Wirkung auf *A. alata* Mesozerkarien bei kurzen Einwirkungszeiten (< 5 Minuten) und niedriger Konzentration (< 1 %) haben.

Tabelle 13: Einwirkung von Salzkonzentration

Salzkonzentration (vol/vol) %	Zeit (Std.)	Vitalität von Mesozerkarien
0,1	4.5	-
0,2	4	-
0,3	3	-
0,4	3	-
0,5	3	-
0,6	2	-
0,7	2	-

(+) **positiv** : vitale Larven

(-) **negativ**: tote Larven

3.4.6 Pepsin-Lösungen

Der niedrige pH-Wert im Magen dient in erster Linie dem Schutz vor kontaminierten Lebensmitteln (GIANNELLA, BROITMAN & ZAMCHECK 1972, PETERSON et al 1989). Die meisten Studien haben gezeigt, dass Bakterien bei einem pH-Wert < 2 abgetötet werden. Jedoch steigt der pH-Wert im Rahmen der Nahrungsaufnahme (ZHU et al. 2006). Zudem sind Darmbakterien oft gegen Säure resistent. Dadurch erhöht sich das Risiko einer Kolonisierung des Darms während des Ingestatransportes und kann somit zu einer Infektion führen (WATERMAN & SMALL 1998). Der Säuregehalt des menschlichen Magens ist abhängig von physiologischen Variablen, die u. a. durch die Nahrungsaufnahme beeinflusst werden. Bei Nahrungskarenz liegt der Magen pH-Wert zwischen 1,5 bis 5,5 (VERDU et al. 1994). Während einer Mahlzeit kommt es zu einem sofortigen Anstieg dieses Wertes bis auf einen pH 6 (KONTUREK et al. 1994; SNEPAR et al. 1982).

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie auch die Wirkung der Pepsinkonzentration auf *A. alata* Mesozerkarien untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Larven (n = 83) bei einem pH-Wert zwischen 1,15 und 1,50 mit einer maximalen Expositionszeit von 240 Minuten abgetötet wurden, wobei die mittlere Zeit bei 30 min und die minimalen Zeit bei 15 min lag.

Einfluss der Temperatur

131 lebende Larven (n = 11) wurden in Glasbecher verbracht und anschließend im Wasserbad auf eine Temperatur von 30 ° C bis maximal 60 ° C erhitzt. Jeder Versuch endete zum dem Zeitpunkt, an dem keine Vitalität (keine Motilität) der Larven mehr zu beobachten war.

Die Parasiten sind bis zu einer Temperatur von 55 ° C vital geblieben. Erst bei Temperaturen ≥ 55 °C wurden die Larven abgetötet (Tabelle 14).

Tabelle 14: Einfluss der Temperatur

Temperatur (°C)	Zeit	Vitalität von <i>A.alata</i> - Mesozerkarien
30	29 Std	+
35	23 Std	+
40	12 Std	+
45	5 Std	+
50	45 min	+
55	10 min	-
60	3 min	-

(+) positiv: Vitale Larven

(-) negativ: Tote Larven

Zusätzlich zu den Versuchen in denen die Hitzeempfindlichkeit von *Alaria alata* Mesozerkarien untersucht wurde, sind weitere Versuche zur Kältetoleranz durchgeführt worden. Larven (n = 12) wurden für 28 Tage (Tabelle 15) im Kühlhaus (4-6 C°) und in jede Woche wurde die Lebensfähigkeit geprüft.

Tabelle 15: Resistenz von *A.alata*-Mesozerkarien gegenüber Kühlung

Tag	Vitalität von <i>A. alata</i> Mesozerkarien
7	+
14	+
21	+
28	-

(+) positiv: Vitale Larven

(-) negativ: Tote Larven

Als Referenzdaten haben wir für unsere Untersuchungen Ergebnisse aus Versuchen mit Trichinellen herangezogen, da es nur unzureichend Literatur über *Alaria alata* gibt. Als Empfehlung für die sichere Inaktivierung von Trichinellen wird angegeben, dass Wildschweinfleisch bei 80 °C

für 10 Minuten erhitzt werden soll (GARI-TOUSSAINT et al. 2005). Die Internationale Kommission für Trichinellose empfiehlt für die sichere Abtötung von Trichinellen, dass infiziertes Fleisch auf eine Kerntemperatur von 65 °C für mindestens 1 Minute zu erhitzen ist. Die Larven sind tot, wenn die Farbe des Fleisches sich von pink nach grau umfärbt (GAMBLE et al. 2000). Für die Kälteinaktivierung wird dem Verbraucher empfohlen, dass die Fleischstücke bis 15 cm mindestens 3 Wochen bei mindestens -15 °C und die Fleischstücke bis zu 69 cm mindestens 4 Wochen bei mindestens -15 °C gefroren werden (GAMBLE et al. 2000). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Kältebehandlung des infizierten Fleisches nicht die humane Alariose verhindern kann. Deshalb besteht ein potentielles Risiko durch diese Behandlungsmethode.

3.4.7 Mikrowellenbehandlungen

Die Larven (n= 35) überlebten eine Behandlung mit einer Wellenlänge von 2,4GHz. und eine Leistung von 8 kW in der Mikrowelle für 15-56 Sekunden und Temperaturen zwischen 38,3 und 44 °C. Beim Schneiden der Proben konnte beobachtet werden, dass einige Fleischteile rötlich geblieben sind. Das heißt, dass die Proben nicht vollständig durcherhitzt bzw. durchgegart wurden. Mikrowellen haben wenig Einfluss auf die Inaktivierung von Parasiten im Vergleich zu den anderen verwendeten Methoden. Entscheidend für das Abtöten von Parasiten in Lebensmitteln ist ein ausreichend langes Einwirken von Hitze. Diese sog. Kumulativbilanz wird bei der Wärmebehandlung in der Mikrowelle durch schnelle Erwärmung nicht ausreichend erreicht (KNUTSON, ELMER, und WAGNER 1987). Es wurde jedoch gezeigt, dass keine Mesozerkarien bei der Behandlung (8 kW) für 75-90 Sekunden bei 53,3-59 °C überlebten (Tabelle 16). Das Risiko von infizierten Fleischprodukten kann somit durch ein entsprechend langes Einwirken von Hitze in der Mikrowelle verhindert werden.

Tabelle 16: Einfluss der Behandlung von infiziertem Fleisch mit Mikrowellenstrahlen auf die Vitalität von *A. alata* Mesozerkarien

Zeit (sek.)	15	25	29	35	45	56	75	90
		+	+	+	+	+	-	-
Fleisch	+	+	+	+	+	+	-	-
Fett	+	+	+	+	+	+	-	-
End-Temp. (°C)	38,3	39,3	40	42,4	45	48	53,3	59

(+) positiv: vitale Larven

(-) negativ: tote Larven

3.4.8 Trocknung

Larven (n=40) überleben den Trocknungsprozess bei Raumtemperatur für maximal 10 Minuten. Bei längerer Austrocknung konnten die Larven nicht mehr reaktiviert werden (Tabelle 17).

Tabelle 17: Einfluss der Trocknung auf die Vitalität von *A. alata*-Mesozerkarien

Zeit (min)	Vitalität von <i>A. alata</i> -Mesozerkarien
10	+
20	-
30	-
60	-

(+) positiv: Vitale Larve

(-) negativ: Tote Larven

Die Untersuchungen zeigen, dass die Tenazität von *A. alata*-Mesozerkarien in artifiziell infiziertem Fleisch sowie in Rohwürsten (Wildschwein und Waschbär) nicht sehr hoch ist. Allerdings besteht ein Risiko der humanen Alariose für den Verbraucher durch den Verzehr einzelner Produkte, unmittelbar nach deren Herstellung. In diesem Zusammenhang erscheint es notwendig, insbesondere Risikogruppen (z.B. Jäger) über die Gefahren solcher Verzehrsgewohnheiten aufzuklären.

3.5 Molekularbiologische Identifizierung und Differenzierung

3.5.1 Nachweis der *Alaria alata* mittel PCR

Die eigenen Untersuchungen zielen einerseits auf die morphologisch-physiologische Differenzierung von *Alaria* spp. Mesozerkarien ab. Zum anderen sollen phänotypisch differente Isolate auf molekularbiologischer Ebene identifiziert und in einem weiteren Schritt charakterisiert werden. Im ersten Schritt der molekularbiologischen Identifikation wurde hierzu ein PCR basiertes Nachweisverfahren zur Identifikation von *Alaria* spp Mesozerkarien entwickelt.

Durch das neuentwickelte PCR Essay ist es erstmals möglich, *Alaria* spp. Isolate auf molekularbiologischer Ebene zu identifizieren.

Es wurden Waschbärenzungen aus Berlin auf das Vorkommen von *Alaria alata* untersucht. Dafür wurden die Gewebeproben der Zungen zunächst in 4% Formaldehydlösung fixiert und anschließend im pathologischen Labor weiter verarbeitet. Für die histologischen Präparate wurde die H.E.-Färbung angewendet. Diese wurden unter 40facher Vergrößerung mit dem Mikroskop durchmustert (Abbildung 44). Dazu wurden auch die Zungen mit dem AMT-Verfahren untersucht. Aus 33 Zungen konnten in 11 Proben mittels AMT-Verfahren verdächtige Larven nachgewiesen werden. Dazu wurden auch die verdächtigen Larven aus den histologischen Präparaten mittels der PCR als *Alaria alata* identifiziert. Die PCR der ribosomalen DNA von 11 verdächtigen *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 45).

Detaillierte Ergebnisse zum Nachweis der *Alaria alata* mittels PCR sind im Anhang

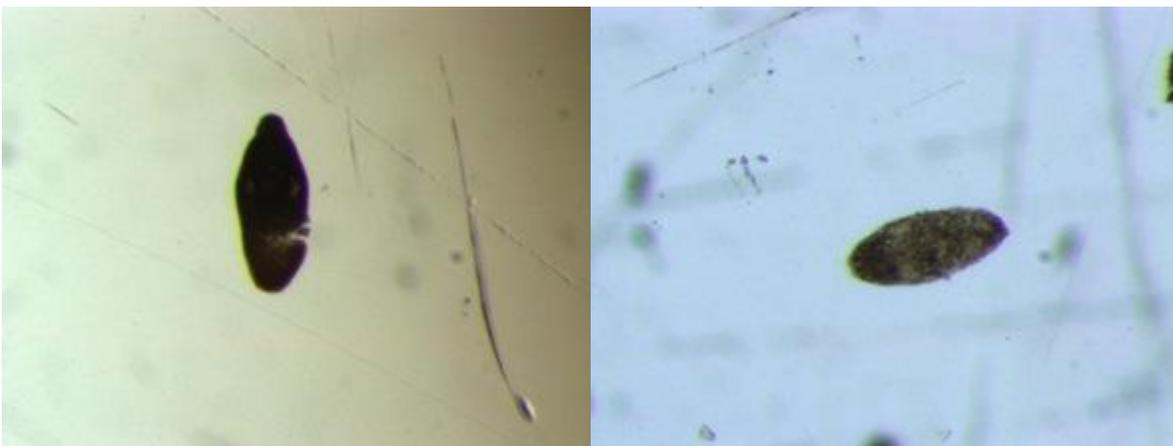


Abbildung 43: Verdächtige tote *Alaria alata* mit AMT isoliert

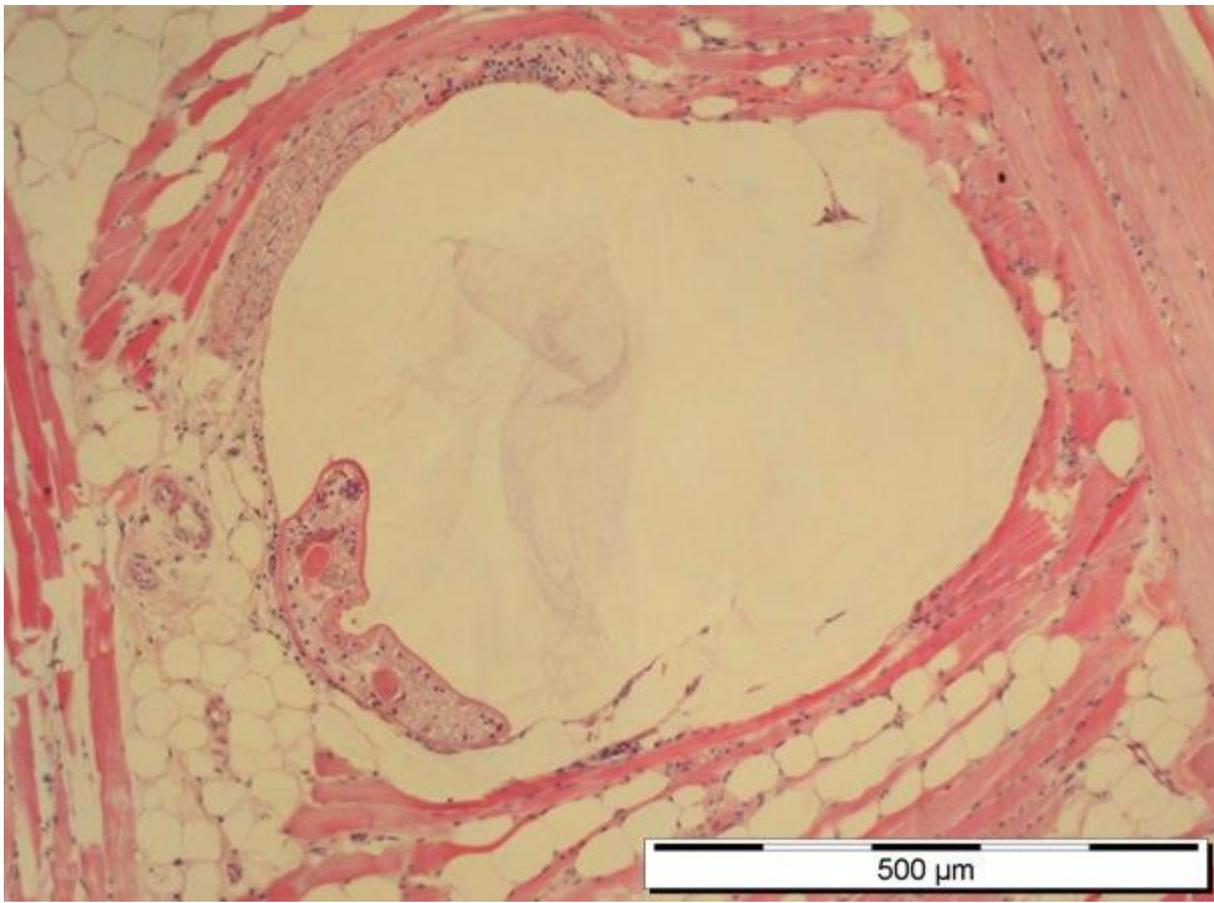


Abbildung 44: Verdächtige *Alaria alata* im histologischen Präparat

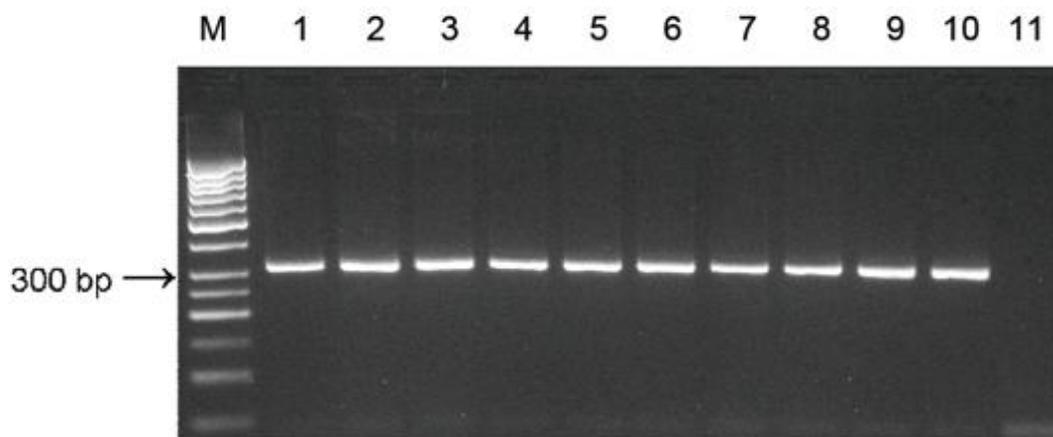


Abbildung 45: Bestätigung der *Alaria alata* aus Waschbären mittels PCR

1 - 5 verdächtige Proben mit AMT isoliert
6 - 9 verdächtige Proben aus histologischen Präparaten
10 positive Kontrolle (BfR)
11 negativ Kontrolle (Trichenella)
M Marker

3.5.2 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Die Methode war für die Bestimmung der Verwandtschaftsgrade noch nicht erfolgreich und muss folglich optimiert werden. Da sich AFLP-Fragmente zum Teil nur um wenige Basenpaare unterscheiden, ist die Agarosegel-Elektrophorese zu einer Analyse nicht geeignet, da sie keine genügend hohe Auflösung bietet (Abbildung 46+47). Die AFLP-Methode zur Bestimmung der genotypischen Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der *Alaria*-Populationen brachte nicht den erhofften Erfolg und muss auch noch optimiert werden. Es bietet sich eine neue molekularbiologische Methode (MLST(Multi Locus Sequence Typing)) an. MLST ist ein neues Typisierungsverfahren, welches auf den Prinzipien der Multilocus-Enzym-Elektrophorese (MLEE) aufbaut. Es wird die genetische Variation der *Alaria* spp untersucht. Das Prinzip der MLST verfolgt also den Aufbau globaler Sequenztypen-Datenbanken vorwiegend mit dem Ziel, die Populationsstruktur- und biologie einzelner Spezies näher aufzuklären.

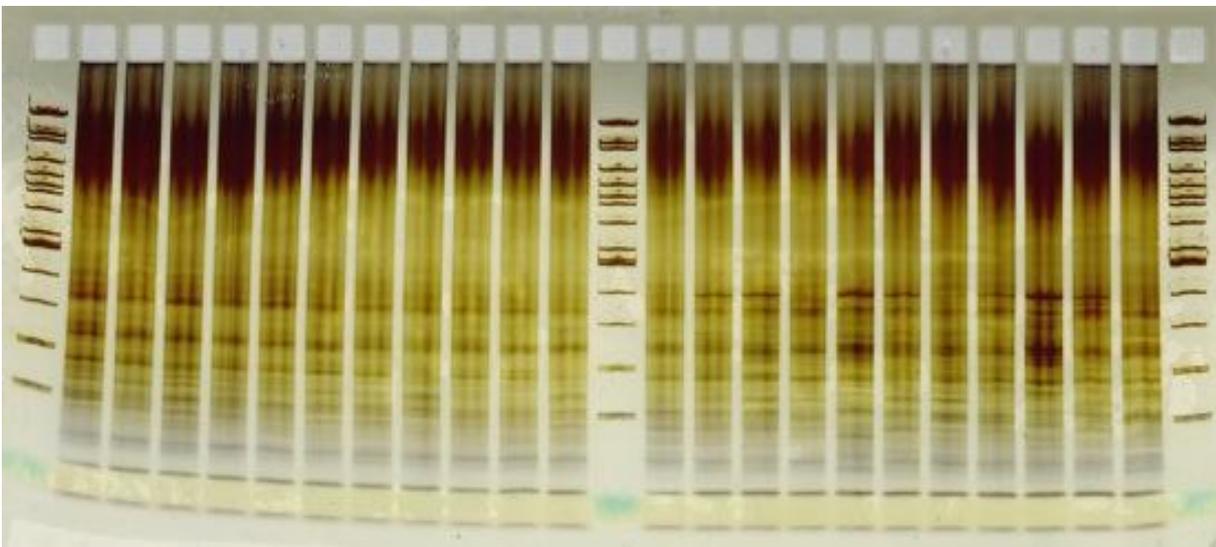


Abbildung 46: Bandenmuster der AFLP-Typisierung

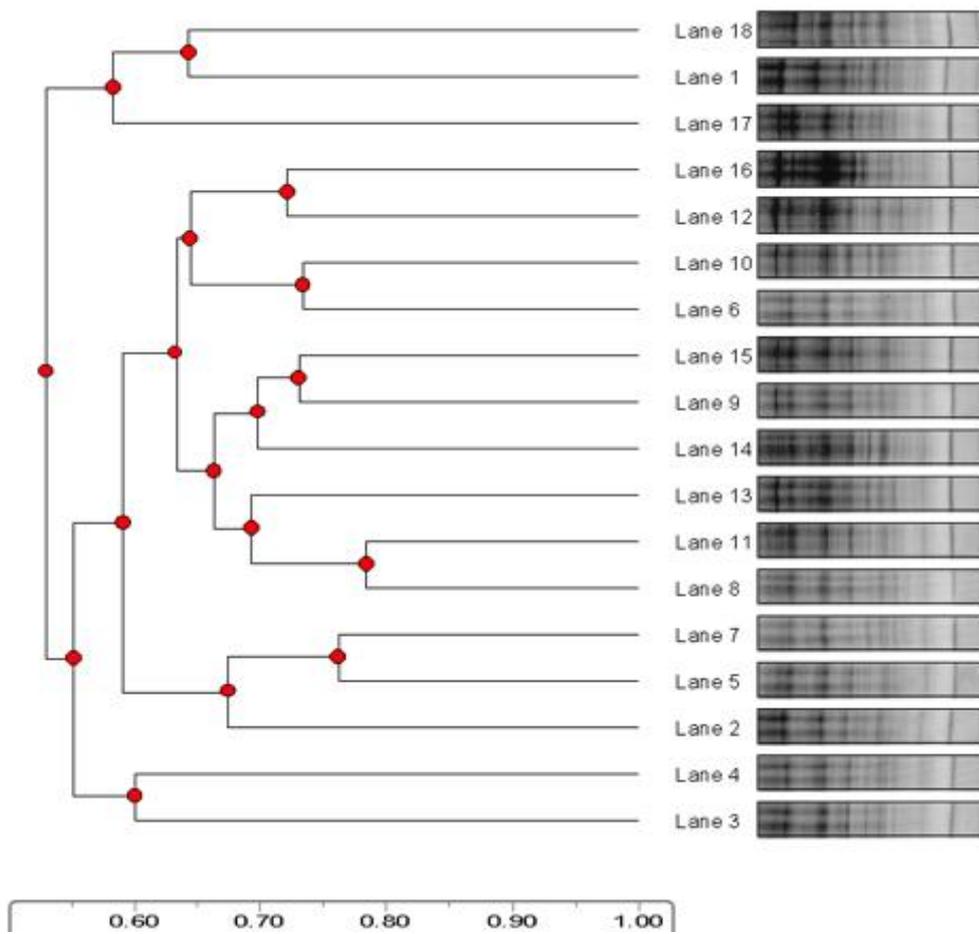


Abbildung 47: Bandenmuster der AFLP-Typisierung

3.6 Vorrassichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die im Rahmen des vorangegangenen Forschungsprojektes 2808HS012 durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Eignung des Magnetrührverfahrens zur künstlichen Verdauung von Sammelproben gem. VO (EG) Nr. 2075/2005 (MRV) zum Nachweis des Duncker'schen Muskel-egels in Wildfleischproben haben früh gezeigt, dass diese Methodik nicht geeignet für dieses Parasiten ist. Die aufgrund dieser Erkenntnis neu entwickelte *Alaria alata* mesocercariae migration technique (AMT) basiert auf einem grundsätzlichen unterschiedlichen Nachweisprinzip. Der größte Vorteil dieses neuen Ansatzes ist, dass, anders als bei artifiziellen Verdaumethoden, vitale Mesozerkarien aus den verdächtigen Geweben isoliert werden können, was sich insbesondere positiv auf die Spezifität der Methode auswirkt. Erste Vergleichsuntersuchungen konnten zudem zeigen, dass die AMT gegenüber dem MRV eine um fast 60 % gesteigerte Sensitivität aufweist. Gleichzeitig ist die Methode aufgrund ihres einfachen Versuchsaufbaus ausgesprochen anwenderfreundlich und robust und kann mit minimalem finanziellem Aufwand in jeder Untersuchungseinrichtung installiert werden. Ein erster Feldversuch (s. Publikation „*Alaria alata* in wild boars (*Sus scrofa*, Linnaeus, 1758) in the eastern parts of Germany“ im Anhang) bestätigte die unter Laborbedingungen gewonnenen Erkenntnisse und zeigte, dass mithilfe der AMT in 33 von 286 vorberichtlich negativen Rückstellproben (11,5 %) *Alaria alata* Mesozerkarien nachgewiesen wurden. Diese Ergebnisse legen nahe, 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 auch als Schnellmethode für den Einsatz in der amtlichen Überwachung eignen könnte. 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 Rahmen des aktuellen Forschungsprojekts wurden aus diesem Grund vier Ringversuche durchgeführt an denen insgesamt 25 Teilnehmer aus 10 Bundesländern sowie ein Labor aus Österreich teilgenommen haben. Die Ringversuche, bei denen die Referenzmaterialien von den Teilnehmern sowohl qualitativ als auch quantitativ untersucht werden sollten, wurden in Anlehnung an und unter wissenschaftlicher Begleitung des Nationalen Referenzlabors für Trichinellen durchgeführt. Erfreulicherweise waren sowohl die qualitativen als auch die quantitativen Ergebnisse der Laboratorien bereits im ersten Ringversuchsteil überraschend gut und bewegten sich schon zu diesem frühen Zeitpunkt im Bereich der Ergebnisse der aktuellen Nationalen Ringversuche zur Detektion von Trichinellen in Fleisch. So wurden in der qualitativen Analyse 96.7% der Proben als richtig positive resp. negativ beurteilt. Zudem wurden die Anzahl der eingesetzten Larven in 43 (47.8%) von insgesamt 90 Proben korrekt richtig ausgezählt und 5 (33.3%) der 15 teilnehmenden Laboratorien konnten ≥ 70 % der in den Proben befindlichen Larven sicher identifizieren. Im Laufe der folgenden Ringversuche konnten sich die Laboratorien kontinuierlich steigern: Im vierten Ring-

versuchsteil gelang es allen Teilnehmern (100%) alle Proben (100%) korrekt als richtig positiv resp. negativ einzustufen. Darüber hinaus hatten zehn (83,3%) der 12 in die Auswertung einbezogenen Laboratorien über 70 % der in den Proben befindlichen Larven sicher identifiziert. Auf der Basis dieser hervorragenden Ergebnisse kann die AMT als Referenzmethode für die Identifikation des Duncker'schen Muskelegels in Fleischproben empfohlen werden und wurde zum Zweck einer möglichen Aufnahme in die Methodensammlung gem. §64 LFGB bereits dem Arbeitskreis der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene und der Lebensmittel tierischer Herkunft tätigen Sachverständigen (ALTS) vorgestellt. Gleichzeitig verdeutlicht die große Bereitschaft der Laboratorien zur Teilnahme an den Ringversuchen das Interesse der amtlichen Überwachung an einer validierten Methode zum Nachweis dieses Parasiten.

Zusätzlich zu ihrem Einsatz in der amtlichen Überwachung können mithilfe der AMT 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. Zukünftig können 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 in diesem Projekt durchgeführten 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.

Die wichtigsten im Rahmen des Forschungsprojektes gewonnenen Erkenntnisse wurden von 2011 bis 2013 in Rahmen von verschiedenen Vorträgen, Postern und Zeitschriftenbeiträgen auf nationaler und internationaler Ebene publiziert (s. Literaturverzeichnis). Ausgewählte Beiträge, die in den internationalen Fachzeitschriften „Parasitology Research“ und „Journal of Helminthology“ erschienen sind, sowie mehrere, z. T. prämierte Posterbeiträge und Abstracts zu ausgewählten Vorträgen finden sich im Anhang.

4 Zusammenfassung

Seit dem Jahr 2002 kommt es auf dem gesamten Gebiet der Bundesrepublik regelmäßig zu Meldungen über Nachweise von Mesozerkarien des parasitären Saugwurms *Alaria alata* in Wildfleisch. Der so genannte Duncker'sche Muskelegel kann durch infiziertes Wildbret auch auf den Menschen übertragen werden. In seiner Stellungnahme Nr. 027/2007 vom 1. Juli 2007 sprach 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 (BfR 2007).

Die Erkenntnisse zur Vorkommenshäufigkeit, zur Organverteilung im Tierkörper sowie zur geographischen Verteilung des DME waren bislang jedoch lückenhaft. Weiterhin fehlte bislang eine spezifische Nachweismethode für *Alaria* spp. Mesozerkarien. Durch die Entwicklung der *Alaria alata* mesocercariae migration technique (AMT) steht nun erstmals eine Methode zur Verfügung, mit welcher die Mesozerkarien in den verschiedenen Geweben der paratenischen Wirte sicher identifiziert werden können (s. Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben 2808HS012). Hauptziel des aktuellen Forschungsvorhabens war die Validierung des neuen Verfahrens mit Hilfe von Ringversuchen (in Verbindung mit der Entwicklung von geeigneten Standardmaterialien sowie einer Methodenoptimierung). Im Rahmen des aktuellen Forschungsprojekts wurden vier Ringversuche durchgeführt an denen insgesamt 25 Teilnehmer aus 10 Bundesländern sowie ein Labor aus Österreich teilnahmen. Die Ringversuche, bei denen die Referenzmaterialien von den Teilnehmern sowohl qualitativ als auch quantitativ untersucht werden sollten, wurden in Anlehnung an und unter wissenschaftlicher Begleitung des Nationalen Referenzlabors für Trichinellen durchgeführt. Die qualitativen als auch die quantitativen Ergebnisse der Laboratorien waren bereits im erste, orientierenden Ringversuchsteil überraschend gut und bewegten sich schon zu diesem frühen Zeitpunkt im Bereich der Ergebnisse der aktuellen Nationalen Ringversuche zur Detektion von Trichinellen in Fleisch. In der qualitativen Analyse wurden 96.7% der Proben als richtig positive resp. negativ beurteilt. Zudem wurden die Anzahl der eingesetzten Larven in 43 (47.8%) von insgesamt 90 Proben korrekt richtig ausgezählt und 5 (33.3%) der 15 teilnehmenden Laboratorien konnten ≥ 70 % der in den Proben befindlichen Larven sicher identifizieren. Im Laufe der folgenden Ringversuche konnten sich die Laboratorien kontinuierlich steigern: Im vierten Ringversuchsteil gelang es allen Teilnehmern (100%) alle Proben (100%) korrekt als richtig positiv resp. negativ einzustufen. Darüber hinaus hatten zehn (83,3%) der 12 in die Auswertung einbezogenen Laboratorien über 70 % der in den Proben befindlichen Larven sicher identifiziert.

Weitere Validierungsparameter, insbesondere Robustheit, Praktikabilität und Effizienz werden von Teilnehmern und Durchführenden der Ringversuche insgesamt als sehr hoch eingestuft. Auf der Basis dieser Ergebnisse kann die AMT als Referenzmethode und Standardmethode für die Identifikation des Duncker'schen Muskelegels in Fleischproben empfohlen werden.

Im Forschungsvorhaben wurden weiterhin Untersuchungen zur Tenazität der *Alaria* Mesozerkarien durchgeführt: Chemikalien, Temperatur, Trocknung, Mikrowellen, Herstellung von Rohschinken, -würsten. Diese sollten eine bessere Bewertung des humanen alimentären Expositionsrisikos, insbesondere im Hinblick auf verarbeitete Wildprodukte, zulassen. Die Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass die Überlebensfähigkeit von *A. alata*-Mesozerkarien in infiziertem Fleisch sowie in Rohwürsten relativ gering ist. Nur unmittelbar nach der Herstellung waren vitale Mesozerkarien in Rohwurstprodukten feststellbar. Im Hinblick aber auf die unterschiedliche Angaben in der Literatur und anderer Arbeitsgruppen zur Tenazität von *Alaria* Mesozerkarien können die eigenen Ergebnisse jedoch noch nicht als hinreichend für die abschließende Angabe von Brauchbarmachungsempfehlungen erachtet werden.

Der im vorhergehenden Forschungsvorhaben neu entwickelte PCR Essay ermöglichte erstmals, *Alaria* spp. Isolate auf molekularbiologischer Ebene zu identifizieren. Im aktuellen Forschungsvorhaben wurde dieser Essay angewendet (histologische Schnitte, eingefrorene Präparate) und dabei weiter entwickelt (Primer, standard operating procedure). Die molekularbiologischen Untersuchungen zur Bestimmung genotypischer Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der *Alaria*-Populationen mittels AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)-Technik waren infolge der Homogenität der Bandenmuster der vorliegenden *Alaria*-Isolat-Population nicht erfolgreich. Hierzu sollte die AFLP-Methodik weiter optimiert und/oder andere Techniken, wie die MLST (Multi Locus Sequence Typing), hinsichtlich ihrer Eignung überprüft werden.

4.1 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Die im Projektantrag definierten Aufgabenstellungen hinsichtlich der Erarbeitung und Optimierung einer geeigneten Methodik (AMT), die Untersuchung der Verteilung der Mesozerkarien im Wirtsgewebe und damit verbunden die Bestimmung potentieller Prädilektionsstellen im Wildschwein konnten im Rahmen der vorgegebenen Projektlaufzeit erfolgreich bearbeitet und abgeschlossen werden.

Das eigne Forschungsprojekt hatte vorrangig die Weiterentwicklung und Validierung der AMT zum Ziel. In mehreren Ringversuchen konnte die gute Eignung der eingesetzten Standardmaterialien erfolgreich getestet werden und gleichzeitig die Optimierung der Untersuchungsmethode sowie die Erarbeitung statistischer Kenngrößen voran getrieben werden. Gleichzeitig bietet der Ringversuch die Möglichkeit, das Verfahren auf seine Eignung als routinemäßiger Schnelltest im Rahmen der amtlichen Überwachung hin zu überprüfen.

Mit der im Rahmen des Forschungsprojektes entwickelten *Alaria* spp. mesocercariae migration technique (AMT) steht nun erstmals eine spezifische Nachweismethode für den Duncker'schen Muskelegel zur Verfügung. Die Methode zeichnet sich neben einer sehr guten Sensitivität und Spezifität durch ein einfaches Handling aus und in der Praxis erprobt. Die Methode wurde bereits in internationalen und nationalen Fachzeitschriften (z. B. RIEHN et al. 2010, RIEHN et al. 2012) publiziert und in mehreren Laborvergleichsuntersuchungen erfolgreich validiert.

In den bislang von uns durchgeführten Studien hinsichtlich der Tenazität des Duncker'schen Muskelegels zeigte sich, dass es deutliche Unterschiede hinsichtlich der Überlebensfähigkeit einzelner *Alaria-alata*-Isolate gibt, wenn diese physikalischen und chemischen Belastungen ausgesetzt wurden.

Auf Grund dessen wurden im Rahmen des aktuellen Forschungsvorhabens weitere *in vitro* und *in vivo* Versuche zur Tenazität der Mesozerkarien im Hinblick auf verschiedene Kochsalz- und NPS-Konzentrationen, Hitzebehandlung, Mikrowellenstrahlen und Trocknung durchgeführt. Zudem wurde die Tenazität von *Alaria alata* gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln wie Alkoholen, Aldehyden, Peressigsäure und Chlor getestet und zusätzlich das Überleben des Parasiten in Ringerlösung und simuliertem Magensaft überprüft. Parallel dazu wurden die Überlebens- und Infektionsfähigkeit von *Alaria alata* in verschiedenen Fleischerzeugnissen (Rohwurst, Rohschinken, Kochpökelwaren) getestet.

Die bislang erfolgten Untersuchungen können jedoch nur einen ersten Hinweis auf die tatsächliche Widerstandsfähigkeit einzelner Isolate geben. Deshalb ist es zwingend erforderlich weitere Daten

auch im Hinblick auf eine eventuelle rechtliche Implementierung von Behandlungsverfahren für die Brauchbarmachung von infiziertem Wildfleisch zu gewinnen.

Die Identifizierung von *Alaria alata* Isolaten auf morphologischer und insbesondere molekularbiologischer Ebene und die Optimierung der PCR-Methode zum Nachweis von *Alaria alata* konnte im Projektzeitraum erfolgreich durchgeführt werden. Die Erfassung der genetischen Diversität innerhalb der europäischen *Alaria alata*-Population mithilfe der AFLP-Analyse konnte noch nicht abgeschlossen werden. Weitere Studien zur Optimierung und Eignungsprüfung der AFLP-Methode und andere Methoden z.B MLST (Multi Locus Sequence Typing) sind unbedingt erforderlich.

5 Literaturverzeichnis

- Agerth E. Muskeldistomen bei einem Wildschweine. Zeitschrift für Fleisch- und Milchhygiene. 1915;25:289.
- Allen JR, Mills JHL. Alaria-Arisaemoides in Saskatchewan Dogs. Can Vet J. 1971;12(1):24-8.
- Andreas K. Helminthen einheimischer Froschlurche. [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Univ. Berlin; 2006.
- Ashton N, Brown N, Easty D. Trematode cataract in fresh water fish. J Small Anim Pract. 1969;10(8):471-8.
- Baars G. Distomeen (Agamodistomum suis) in der Muskulatur des Schweines. Tierärztl Rdsch. 1942;48:255-7.
- Baer JG. Ecology of animal parasites. Univ of Illinois Press, Urbana III, 1951. 1951.
- Baermann G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Welteureden Batavia Geneesk Lab Feestbundel. 1917;41-7.
- BAFU (Hrsg.): Einstufung von Organismen: Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Vollzug Nr. 1114;2011 <www.bafu.admin.ch/uv-1114-d>
- Bagrade G, Kirjusina M, Vismanis K, Ozolins J. Helminth parasites of the wolf Canis lupus from Latvia. J Helminthol. 2009;83(1):63-8.
- Balicka-Ramisz A, Ramisz A, Pilarczyk B, Bienko R. Fauna of gastro-intestinal parasites in red foxes in Western Poland. Medycyna Weterynaryjna. 2003;59(10):922-5.
- Beane RD, Hobbs NT. The Baermann Technique for Estimating Protostrongylus Infection in Big-horn Sheep - Effect of Laboratory Procedures. J Wildl Dis. 1983;19(1):7-9.
- Beaver PC, Little MD, Tucker CF, Reed RJ. Mesocercaria in the skin of man in Louisiana. Am J Trop Med Hyg. 1977;26(3):422-6.
- Beutling DM. Lehrbuch der Schlachtvieh und Fleischuntersuchung. 1. Aufl. Stuttgart: Parey Verlag; 2004.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) 2007. Wildschweinfleisch kann den gesundheitsgefährlichen Duncker'schen Muskelegel enthalten - Stellungnahme Nr. 027/2007 des BfR vom 1. Juli

2007,

<http://www.bfr.bund.de/cm/343/wildschweinfleisch_kann_den_gesundheitsgefahrlichen_duncker_schen_muskelegel_enhalten.pdf>

Bialasiewicz AA. [Neuroretinitis]. *Ophthalmologe*. 2000;97(5):374-91.

Bork K. *Arzneimittelnebenwirkungen an der Haut*. 2. Aufl. Stuttgart und New York: Schattauer, F.K. Verlag; 1999.

Bosma NJ. *Alaria Mustelae* sp. nov., a trematode requiring four hosts. *Science*. 1931;74(1925):521-2.

Bosma NJ. The life history of the trematode *Alaria mustelae*, Bosma, 1931. *Trans Am Microsc Soc*. 1934;53(2):116-53.

Bridger KE, Whitney H. Gastrointestinal parasites in dogs from the Island of St. Pierre off the south coast of Newfoundland. *Vet Parasitol*. 2009;162(1-2):167-70.

Bugge G. Der Muskelegel Dunckers beim Frosch. *Zschr Fleisch-Milchhyg*. 1942;54:73-6.

Bugge G. Das sogenannte Muskeldistomum, *Agamodistomum suis*, ein Bewohner der Bauchhöhle des Schweines. *Tierärztl Rdsch*. 1942;48:146-51.

Bugge G. Der Muskelegel Dunckers beim Dachs. *Zschr Fleisch- und Milchhyg*. 1943;53:101-2.

Burrows RB, Lillis WG. Trematodes of New Jersey dogs and cats. *J Parasitol*. 1965;51:570-4.

Byers B, Kimura SJ. Uveitis after death of a larva in the vitreous cavity. *Am J Ophthalmol*. 1974;77(1):63-6.

Castro O, Venzal JM, Felix ML. Two new records of helminth parasites of domestic cat from Uruguay: *Alaria alata* (Goeze, 1782) (Digenea, Diplostomidae) and *Lagochilascaris major* Leiper, 1910 (Nematoda, Ascarididae). *Vet Parasitol*. 2009;160(3-4):344-7.

Cort WW. The excretory system of *Agamodistomum marcianae* (LaRue), the agamodistome stage of a fork-tailed cercaria. *J Parasitol*. 1918;4:130-4.

Cort WW, Ackert JE, Augustine DL, Payne FK. Investigations on the control of hookworm disease. II. The description of an apparatus for isolating infective hookworm larvae from soil. *Am J Hyg*. 1922;2:1-16.

Craig HL, Craig PS. Helminth parasites of wolves (*Canis lupus*): a species list and an analysis of published prevalence studies in Nearctic and Palaearctic populations. *J Helminthol.* 2005;79(2):95-103.

Cuckler AC. Studies on the migration and development of *Alaria* spp. (Trematoda: *Strigeata*) in the definitive host. *J Parasitol Suppl.* 1940;26:36.

Cuckler AC. Morphological and biological studies on certain strigeid trematodes of mammals. Summaries of Ph D Theses, Univ of Minnesota, Minneapolis, Minn. 1949;4:45-7.

Curtsinger CL, Shoop WL. Eosinophil levels in *Alaria marcianae* (Trematoda) infected mice. *J Parasitol.* 1986;72(3):477-8.

Dalimi A, Sattari A, Motamedi G. A study on intestinal helminthes of dogs, foxes and jackals in the western part of Iran. *Vet Parasitol.* 2006;142(1-2):129-33.

Dick TA, Leonard RD. Helminth parasites of fisher *Martes pennanti* (Erleben) from Manitoba, Canada. *J Wildl Dis.* 1979;15(3):409-12.

DJV Wildschweinbraten bleibt Nummer eins auf dem Teller *unter:*
http://www.jagdnetz.de/news?meta_id=3204 .

Dönges J. Entwicklungs- und Lebensdauer von Metacercarien. *Z Parasitenkd.* 1969;31:340-66.

Dubey, J. P. 1997, "Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues", *Veterinary Parasitology*, vol. 74, pp. 75-77.

Duncker HCJ. Distomeen im Schweinefleisch. *Zschr mikr Fleischschau.* 1881a;2(3):23-4.

Duncker HCJ. Muskel-Distomeen. *Zschr mikr Fleischschau.* 1881b;2(4):141.

Duncker HCJ. Distomeen im Schweinefleisch. *Zschr mikr Fleischschau.* 1884;3:39-42.

Duncker HCJ. Die Muskel-Distomeen. *Berl Tierärztl Wochenschr.* 1896;24:279-82.

Duncker HCJ. Die Muskel-Distomeen. *Zschr Fleisch-Milchhyg.* 1897;7:197-8.

Egger G. Die akute Entzündung: Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der unspezifischen Immunität . 1. Aufl. Wien: Springer Vienna; 2005.

Eira C, Vingada J, Torres J, Miquel J. The helminth community of the red fox, *Vulpes vulpes*, in Dunas De Mira (Portugal) and its effect on host condition. *Wildl Biol Pract.* 2006;2(1):26-36.

Enigk K. Geschichte der Helminthologie im deutschsprachigen Raum. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag; 1986.

Fallis AM, Freeman RS, Walters J. What eyes reveal. The light of the body is the eye. *Can J Public Health*. 1973;64(3):238-45.

Fernandes BJ, Cooper JD, Cullen JB, Freeman RS, Ritchie AC, Scott AA et al. Systemic infection with *Alaria americana* (Trematoda). *Can Med Assoc J*. 1976;115(11):1111-4.

Fischthal JH, Martin RL. *Alaria* (*Alaria*) *marcianae* (LaRue 1917) Walton 1950 (Trematoda: Diplostomatidae) from a mountain lion, *Felis concolor acrocodia* Goldman, From Paraguay. *J Parasitol*. 1977;63(2):202.

Foster GW, Cunningham MW, Kinsella JM, McLaughlin G, Forrester DJ. Gastrointestinal helminths of free-ranging Florida panthers (*Puma concolor coryi*) and the efficacy of the current anthelmintic treatment protocol. *J Wildl Dis*. 2006;42(2):402-6.

Foster GW, Kinsella JM, Sheppard BJ, Cunningham MW. Transmammary infection of free-ranging Florida panther neonates by *Alaria marcianae* (Trematoda: Diplostomatidae). *J Parasitol*. 2009;95(1):238-9.

Freeman RS, Stuart PF, Cullen SJ, Ritchie AC, Mildon A, Fernandes BJ et al. Fatal human infection with mesocercariae of the trematode *Alaria americana*. *Am J Trop Med Hyg*. 1976;25(6):803-7.

Gamblea, H. R., Bessonov AS, Cuperlovic, K., Gajadhar AA, van Knapen F, Noeckler, K., Schenone H, & Zhuh, X. 2000, "International Commission on Trichinellosis: Recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption", *Veterinary Parasitology*, vol. 93, pp. 393-408.

Gari-Toussaint, M., Tieulié, N., Baldin, J., Dupouy-Camet, J., Delaunay, P., & Fuzibet, J. 2005, "Human Trichinellosis due to *Trichinella Britovi* in Southern France after consumption of frozen wild boar meat", *Euro Surveill*, vol. 10, no. 6, pp. 117-118.

Giannella, R. A., Broitman, S. A., & Zamcheck, N. 1972, "Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies *in vivo* and *in vitro*", *Gut*, vol. 13, pp. 251-256.

Goldberg SR, Bursey CR, Cheam H. Helminths of two native frog species (*Rana chiricahuensis*, *Rana yavapaiensis*) and one introduced frog species (*Rana catesbeiana*) (Ranidae) from Arizona. *J Parasitol*. 1998;84(1):175-7.

Goldberg SR, Burse CR, McKinnell RG, Tan IS. Helminths of northern leopard frogs, *Rana pipiens* (Ranidae), from North Dakota and South Dakota. *Western North American Naturalist*. 2001;61(2):248-51.

Goldberg SR, Burse CR. Gastrointestinal helminths of the blackneck garter snake, *Thamnophis cyrtopsis* (Colubridae). *Western North American Naturalist*. 2002;62(2):243-5.

Gorski P, Zalewski A, Lakomy M. Parasites of carnivorous mammals in Bialowieza Primeval Forest. *Wiad Parazytol*. 2006;52(1):49-53.

Goüy de Bellocq J, Sarà M, Casanova JC, Feliu C, Morand S. A comparison of the structure of helminth communities in the woodmouse, *Apodemus sylvaticus*, on islands and the western Mediterranean and continental Europe. *Parasitol Res*. 2003;90:64-70.

Große K, Wüste T. Funde des Duncker'schen Muskelegels bei der Trichinenuntersuchung mittels Verdauungsverfahren. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 45. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets „Lebensmittelhygiene“; 2004 Sep 28 – Okt 01; Garmisch-Partenkirchen, Deutschland.

Große K, Wüste T. Funde des Dunckerschen Muskelegels bei der Trichinenuntersuchung mittels Verdauungsverfahrens. 5. Fleisch- und Geflügelfleischhygienetagung; 2005 März; Berlin, Deutschland.

Große K, Wüste T. Der Duncker'sche Muskelegel, Funde bei der Trichinenuntersuchung mittels Verdauungsverfahren. *Fleischwirtschaft*. 2006;86(4):106-8.

Große K, Wüste T. Duncker'scher Muskelegel - Risiko für den Verbraucher? Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung. 2008a;5:208-9.

Große K, Wüste T. Duncker'scher Muskelegel - Risiko für den Verbraucher? 8. Fachtagung Fleisch- und Geflügelfleischhygiene für Angehörige der Veterinärverwaltung; 2008b März 04 – 05; Berlin, Deutschland.

Hasslinger DrMA, Nagler DrM. Zur Bedeutung des "Duncker'schen Muskelegels" (*Agamodistomum suis*, Stiles 1908). *Fleischwirtschaft*. 1969;49:1062-3.

Hedges TR. Diffuse unilateral subacute neuroretinopathy. In: Albert DM, Jakobiec FA, eds. *Principles and Practice of Ophthalmology*. Philadelphia, PA: Saunders; 2000;3:2167-71.

Hiepe Th. Lehrbuch der Parasitologie Band 3: Veterinärmedizinische Helminthologie. Stuttgart, Jena: Fischer Verlag; 1985.

Hofer DP, Johnson AD. Alaria-Mustelae, A-Marcianae, and A-Arisaemoides - Chemical Nature of Mesocercarial Capsule. *Trans Am Microscop Soc.* 1970;89(2):254-&.

Iastreba VB, Gorokhov VV, Shestakov AM. [To the detection of the trematode mesocercariae Alaria alata in the blood of domestic dogs and cats]. *Med Parazitol (Mosk).* 2005;(4):48-51.

Ivanov VM, Semenova N.N. Parasitological consequences of animal introduction. *Russ j Ecol.* 2000;31(4):281-3.

Jakšić S, Uhitil S, Vucemilo M. Mesocercariae of fluke Alaria alata determined in wild boar meat. *Zschr Jagdwiss.* 2002;48(3):203-7.

Jogeland PTJ, Raue H, Petersson U. Inventering av anvertesparasiter hos hundar i Skane 1999-2000 (Inventory of internal parasites in dogs in Skane 1999-2000). *Svensk Veterinartidning.* 2002;54(13):635-7.

Johnson AD. Life history of Alaria marcianae (La Rue, 1917) Walton, 1949 (Trematoda: Diplostomatidae). *J Parasitol.* 1968;54(2):324-32.

Johnson AD, Bury R, Alawiye O. Survival of Mesocercariae of Alaria-Arisaemoides, Alaria-Marcianae, and Alaria-Mustelae (Trematoda, Diplostomatidae) In vitro. *Trans Am Microscop Soc.* 1985;104(2):172-7.

Joyeux Ch, Baer JG. Les hôtes d'attente dans le cycle évolutif des helminthes. *Biol Med Paris.* 1934;24(9):482-506.

Kimber KR, Kollias GV. Infectious and parasitic diseases and contaminant-related problems of North American river otters (*Lontra canadensis*): a review. *J Zoo Wildl Med.* 2000;31(4):452-72.

Kramer MH, Eberhard ML, Blankenberg TA. Respiratory symptoms and subcutaneous granuloma caused by mesocercariae: a case report. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(4):447-8.

Kulisic Z, Pavlovic I, Milutinovic M, Aleksic-Bakrac N. Intestinal parasites of dogs and role of dogs in epidemiology of larva migrans in the Belgrade area. *Helminthologia.* 1998;35(2):79-82.

Knutson, K. M., Elmer, H. M., & Wagner, M. K. 1987, "Microwave heating of food", *Ftmd Sci. Technol.*, vol. 211, no. II, pp. 1-111.

Konturek, J. W. P., Thor, P., Maczka, M., Stoll, R., Domschke, W., & Konturek, S. J. 1994, "Role of cholecystokinin in the control of gastric emptying and secretory response to a fatty meal in normal subjects and duodenal ulcer patients", *Scand.J.Gastroenterol*, vol. 29, pp. 583-590.

Leibovitz L, Riis RC, Georgi ME. Digenetic trematode infection. J Am Vet Med Assoc. 1980;177(1):40,42.

Lerche M, Goerttler V, Rievel H. Lehrbuch der tierärztlichen Lebensmittelüberwachung. Hannover: Verlag M&H Schaper. 1957.

Lester RJ, Freeman RS. Penetration of vertebrate eyes by cercariae of *Alaria marcianae*. Can J Public Health. 1975;66(5):384-7.

Lester RJ, Freeman RS. Survival of two trematode parasites (*Diplostomum* spp.) in mammalian eyes and associated pathology. Can J Ophthalmol. 1976;11(3):229-34.

Lewin J. Parasites of *Lacerta vivipara* Jacquin, 1787 in Poland. Acta Parasitologica. 1992;37(2):79-82.

Loos-Frank B, Zeyhle E. The intestinal helminths of the red fox and some other carnivores in southwest Germany. Z Parasitenkd. 1982;67(1):99-113.

Löscher T, von Sonnenburg F. Parasitosen, In: Therapie innerer Krankheiten von G. Paumgartner und G. Steinbeck , 11. Aufl. Berlin: Springer; 2005.

Lucius R, Böckeler W, Pfeiffer AS. Parasiten der Haus-, Nutz- und Wildtiere Schleswig-Holsteins: Parasiten der inneren Organe des Rotfuchses (*Vulpes vulpes*). Z Jagdwiss. 1988;34:242-55.

Madsen LR, Johnson AD. Development of *Alaria mesocercariae* on the chick chorioallantoic membrane and in mice and chicks. Trans Am Microsc Soc. 1974;93(1):106-12.

Manke KJ, Stoye M. Parasitological studies of red foxes (*Vulpes vulpes* L.) in the northern districts of Schleswig-Holstein. Tierärztl Umsch. 1998;53(4):207-14.

Mappes T. *Trichinella spiralis*. 2001 (zitiert vom 13.05.2012) <<http://www.musoptin.com/trichinella.html>>

Martinez FA, Rigonatto T, Nunez SE, Troiano JC, Gauna Anasco L, Duchene A et al. Hallazgo de *Alaria* sp. (Trematoda, Strigeiidea) en carnivoros silvestres. Comunicaciones Cientificas y Tecnológicas 2000, Universidad Nacional del Nordeste. 2000.

McCue JF, Thorson RE. Behavior of Parasitic Stages of Helminths in Thermal Gradient. J Parasitol. 1964;50(1):67.

McDonald HR, Kazacos KR, Schatz H, Johnson RN. Two cases of intraocular infection with *Alaria mesocercaria* (Trematoda). Am J Ophthalmol. 1994;117(4):447-55.

- Metaxopoulos, J., Genigeorgis, C., Fanelli, M. J., Franti, C., & Cosma, E. 1981, "Production of Italian dry salami: Effect of starter culture and chemical acidulation on Staphylococcal growth in Salami under commercial manufacturing conditions", *Applied and Environmental Microbiology* pp. 863-871.
- Mehlhorn H. Encyclopedia of Parasitology. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2008.
- Miller GC. Helminths and the Transmammary Route of Infection. *Parasitology*. 1981;82(APR):335-42.
- Miller GC. Longevity of Pharyngostomoides-Procyonis (Strigeoidea, Diplostomatidae) in the Raccoon, Procyon-Lotor. *J Parasitol*. 1984;70(2):284-5.
- Moks E, Jogisalu I, Saarma U, Talvik H, Jarvis T, Valdmann H. Helminthologic survey of the wolf (*Canis lupus*) in Estonia, with an emphasis on *Echinococcus granulosus*. *J Wildl Dis*. 2006;42(2):359-65.
- Möhl K, Grosse K, Hamedy A, Wuste T, Kabelitz P, Lucker E. Biology of *Alaria* spp. and human exposition risk to *Alaria mesocercariae*-a review. *Parasitol Res*. 2009;105(1):1-15.
- Nikitina EN. Trematode larvae in snails of Lake Glubukoe. *Hydrobiologia*. 1986;141:139-41.
- Odening K. Studien an Trematoden aus Schlangen, Vögeln und Säugetieren. *Monatsber Dtsch Akad Wiss Bln*. 1960;2(7):437-55.
- Odening K. Zur Kenntnis des Exkretionssystems einiger digenetischer Trematoden (Unterordnungen *Plagiorchiata*, *Brachylaemata*, *Strigeata*). *Z Parasitenkd*. 1961;204:440-56.
- Odening K. Der "Dunckersche Muskelegel" kann experimentell auf den Affen übertragen werden. *Monatshefte für Veterinärmedizin*. 1961;16:395-9.
- Odening K. Zur Diagnostik der Mesocercarie von *Alaria alata*, eines möglichen Parasiten des Menschen in Europa, an Hand experimenteller Befunde beim Affen. *Monatsber Dtsch Akad Wiss Bln*. 1963;5:385-90.
- Ostertag Rv, Schönberg F. Lehrbuch der Schlachtier- und Fleischuntersuchung. Stuttgart: Enke; 1955.
- Papadopoulos H, Himonas C, Papazahariadou M, AntoniadouSotiriadou K. Helminths of foxes and other wild carnivores from rural areas in Greece. *J Helminthol*. 1997;71(3):227-31.

Papazahariadou A, Founta A, Papadopoulos E, Chliounakis S, Antoniadou-Sotiriadou K, Theodorides Y. Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, Northern Greece. *Vet Parasitol.* 2007;148(2):170-3.

Paunovic V. Helminthoses of dogs in the municipality of Zrenjanin. *Veterinarski glasnik.* 1994;48:905-8.

Pearson JC. Studies on the life cycles and morphology of the larval stages of *Alaria arisaemoides* (Augustine and Uribe, 1927) and *Alaria canis* (LaRue and Fallis, 1936) (Trematoda: *Diplostomidae*). *Can J Zool.* 1956;34:295-387.

Pence DB, Knowlton FF, Windberg LA. Transmission of *Ancylostoma caninum* and *Alaria marcianae* in coyotes (*Canis latrans*). *J Wildl Dis.* 1988;24(3):560-3.

Peterson, W. L., Mackowiak, P. A., Barnett, C. C., Marling-Cason, M., & Haly, M. L. 1989, "The human gastric bactericidal barrier: mechanisms of action, relative antibacterial activity, and dietary influences", *J.Infect.Dis.*, vol. 159, pp. 979-983.

Pfeiffer AS, Böckeler W, Lucius R. Parasiten der Haus-, Nutz- und Wildtiere Schleswig-Holsteins: Parasiten der inneren Organe des Steinmarders (*Martes foina*). *Z Jagdwiss.* 1989;35:100-12.

Popiolek M, Szczesna J, Nowak S, Myslajek RW. Helminth infections in faecal samples of wolves *Canis lupus L.* from the western Beskidy Mountains in southern Poland. *J Helminthol.* 2007;81(4):339-44.

Potekhina LF. [Cycle of the development of the agent of alariosis in the fox and dog.]. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 1951;76(2):325-7.

Ramisz A, Balicka-Ramisz A. The prevalence of *Alaria alata* in red foxes (*Vulpes vulpes L.*) in the western part of Poland. *Tierärztl Umsch.* 2001;56(8):423-5.

Ransom, B., Schwartz, B., & Raffensperger, H. 1920, "Effects of pork curing processes on trichinae", *Bull No.880, USDA, Washington, D.C.*

Rau ME, Gordon DM. Overwintering of Helminths in Garter Snake (*Thamnophis-Sirtalis-Sirtalis*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie.* 1978;56(8):1765-7.

Riehn K, Hamedy A, Grosse K, Zeitler L, Lucker E. A novel detection method for *Alaria alata mesocercariae* in meat. *Parasitol Res.* 2010;107(1):213-20.

Riehn K, Hamedy A, Grosse K, Wüste T, Lücker E (2012) *Alaria alata* in wild boars (*Sus scrofa*, Linnaeus, 1758) in the eastern parts of Germany. *Parasitol Res.* 2012 Oct;111(4):1857-61

Riis RC, Georgi ME, Leibovitz L, Smith JS. Ocular Metacercarial Infection of the Oyster Toadfish, *Opsanus-Tau* (L). *J Fish Dis.* 1981;4(5):433-5.

Ruas JL, Muller G, Farias NA, Gallina T, Lucas AS, Pappen FG et al. [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.* 2008;17(2):87-92.

Savinov VA. 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 Skrjabina*, pp. 1953;611-6.

Savinov VA. Die Entwicklung von *Alaria alata* (Goeze, 1782) im Körper der Hunde (russ.). *Trudy vsesojuznogo Instituta Gel`mintologii im Akad K I Skrjabina.* 1953;5:63-4.

Savinov VA. Zur Frage einiger Besonderheiten der Stadienentwicklung der *Strigeata* und der Rolle der verschiedenen Wirte in dieser Entwicklung (russ.). *Ucen Zap vologodsk ped Inst.* 1954;15:245-306.

Schnieder T. *Veterinärmedizinische Parasitologie*, Begr. v. J. Boch u. R. Supperer, 6. Aufl. Stuttgart: Parey; 2006.

Schott E, Müller B. Zum Vorkommen von *Echinococcus multilocularis* beim Rotfuchs im Regierungsbezirk Tübingen. *Tierärztl Umsch.* 1989;44:367-70.

Segovia JM, Torres J, Miquel J. The red fox, *Vulpes vulpes* L., as a potential reservoir of zoonotic flukes in the Iberian Peninsula. *Acta Parasitologica.* 2002;47(2):163-6.

Segovia JM, Guerrero R, Torres J, Miquel J, Feliu C. Ecological analyses of the intestinal helminth communities of the wolf, *Canis lupus*, in Spain. *Folia Parasitologica.* 2003;50(3):231-6.

Shea M, Maberley AL, Walters J, Freeman RS, Fallis AM. Intraretinal larval trematode. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1973;77(6):OP784-OP791.

Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV. Helminth fauna of lizards (Reptilia, Sauria) in the southern part of Belarus. *Parasitol Res.* 2000a;86(4):343.

Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV. Helminth fauna of otter (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res.* 2000b;86(6):528.

Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of the wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res.* 2000a;86(2):163-4.

Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of snakes (Reptilia, Serpentes) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res.* 2000b;86(4):340-1.

Shimalov VV, Shimalov VT, Shimalov AV. Helminth fauna of newts in Belorussian Polesie. *Parasitol Res.* 2001;87(4):356.

Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of the European mole (*Talpa europaea* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res.* 2001a;87(9):790-1.

Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of the American mink (*Mustela vison* Schreber, 1777) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res.* 2001b;87(10):886-7.

Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of toads in Belorussian Polesie. *Parasitol Res.* 2001c;87(1):84.

Shimalov VV, Shimalov VT. [*Alaria alata* (Trematoda: Alariidae)--the parasite of canines in the Belorussian woodlands]. *Parazitologiya.* 2001d;35(1):77-80.

Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of the European polecat (*Mustela putorius* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res.* 2002a;88(3):259-60.

Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of the racoon dog (*Nyctereutes procyonoides* Gray, 1834) in Belorussian Polesie. *Parasitol Res.* 2002b;88(10):944-5.

Shimalov VV. Helminth fauna of the striped field mouse (*Apodemus agrarius* Pallas, 1778) in ecosystems of Belorussian Polesie transformed as a result of reclamation. *Parasitol Res.* 2002;88(11):1009-10.

Shimalov VV, Shimalov VT. Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in southern Belarus. *Parasitol Res.* 2003;89(1):77-8.

Shoop WL, Corkum KC. Epidemiology of *Alaria marcianae* mesocercariae in Louisiana. *J Parasitol.* 1981;67(6):928-31.

Shoop WL, Corkum KC. Migration of *Alaria marcianae* (Trematoda) in domestic cats. *J Parasitol.* 1983;69(5):912-7.

- Shoop WL, Corkum KC. Transmammary infection of paratenic and definitive hosts with *Alaria marcianae* (trematoda) mesocercariae. *J Parasitol.* 1983;69(4):731-5.
- Shoop WL, Corkum KC. Pathway of mesocercariae of *Alaria marcianae* (Trematoda) through the mammary glands of lactating mice. *J Parasitol.* 1984;70(3):333-6.
- Shoop WL, Corkum KC. Tegumental changes of *Alaria marcianae* (Trematoda) during migration in the domestic cat. *J Parasitol.* 1984;70(2):244-52.
- Shoop WL, Corkum KC. Transmammary infection of newborn by larval trematodes. *Science.* 1984;223(4640):1082-3.
- Shoop WL. Invitro Migration of *Alaria-Marcianae* (Trematoda) Mesocercariae in A Thermal-Gradient. *J Parasitol.* 1985;71(6):728-31.
- Shoop WL, Corkum KC. Maternal transmission by *Alaria marcianae* (Trematoda) and the concept of amphiparatensis. *J Parasitol.* 1987;73(1):110-5.
- Shoop WL, Font WF, Malatesta PF. Transmammary transmission of mesocercariae of *Alaria marcianae* (Trematoda) in experimentally infected primates. *J Parasitol.* 1990;76(6):869-73.
- Shoop WL. Vertical Transmission of Helminths - Hypobiosis and Amphiparatensis. *Parasitology Today.* 1991;7(2):51-4.
- Sielaff H. *Trichinenschau.* Jena: Gustav Fischer Verlag; 1962.
- Smith, H. J., Messier, S., & Tittiger, F. 1989, "Destruction of *Trichinella spiralis spiralis* During the Preparation of the "Dry Cured" Pork Products Proscuitto, Proscuittini and Genoa Salami", *Can J Vet Res*, vol. 53, pp. 80-83.
- Smyth JD. Rare, new and emerging helminth zoonoses. *Adv Parasitol.* 1995;36:1-45.
- Snepar, R., Poporad, G. A., Romano, J. M., Kobasa, W. B., & Kay, D. 1982, "Effect of cimetidine and antacid on gastric microbial flora", *Infect.Immun*, vol. 36, pp. 518-524.
- Steinbach G, Welzel A, Keyserlingk Mv, Stoye M. Zur Helminthenfauna des Rotfuchses (*Vulpes vulpes L.*) in Südniedersachsen Teil 1: Nematoden und Trematoden. *Z Jagdwiss.* 1994;40:30-9.
- Steinbach HJ. Schwarzwild - Wehrhaftes Wild. 2010 (zitiert vom 27.04.2012): Deutsche Jagdzeitung. <<http://www.djz.de/447,708/>>
- Sudarikov VE. Die biologischen Besonderheiten der Trematoden der Gattung *Alaria*. *Trudy gel'mintol Labor Akad Nauk SSSR.* 1959;9:326-32.

- Sudarikov WE (1960). In: Skrjabin KI Trematodes of animals and man, essentials of trematodology. Ac Sci USSR Helm Lab, Moskow (1960), Israel program f. sci. Transl. (1965)
- Szczesna J, Popiolek M, Schmidt K, Kowalczyk R. Coprological study on helminth fauna in Eurasian lynx (*Lynx lynx*) from the Bialowieza Primeval forest in eastern Poland. *J Parasitol.* 2008;94(4):981-4.
- Thiess A, Schuster R, Nockler K, Mix H. Helminth findings in indigenous racoon dogs *Nyctereutes procyonoides* (Gray, 1834). *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 2001;114(7-8):273-6.
- Thiess A. Untersuchungen zur Helminthenfauna und zum Vorkommen von *Trichinella* sp. beim Marderhund (*Nyctereutes procyonoides*) in Brandenburg. [Dissertation med. vet]. Berlin: Freie Univ. Berlin; 2004.
- Thorson RE, McCue JF, Mueller JF. Thermotactic Response of *Spirometra* Plerocercoids. *J Parasitol.* 1964;50(4):529-&.
- Todd KS, Levine ND, Andersen FL. An Evaluation of Baermann Technic Using Infective Larvae of *Haemonchus-Contortus*. *Proc Helminthol Soc Wash.* 1970;37(1):57-&.
- Unruh DH, King JE, Eaton RD, Allen JR. Parasites of dogs from Indian settlements in northwestern Canada: a survey with public health implications. *Can J Comp Med.* 1973;37(1):25-32.
- Vallée I, Ferte H, Jouet D, Polack B, Laine-Prade V, Mace P et al. Identification of the trematode *Alaria alata* in wild boar in east of France. European Multikolloquium of Parasitology, 24 08 -28 08 2008, Paris. 2006.
- Verdu, E., Viani, F., Armstrong, D., Fraser, R., Siegrist, H. H., Pignatelli, B., Idstrom, J. P., Lederberg, C., Blum, A. L., & Fried, M. 1994, "Effect of omeprazole on intragastric bacterial counts, nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds", *Gut*, vol. 35, pp. 455-460.
- Wallace FG. The life cycle of *Pharyngostomum cordatum* (Diesing) Ciurea (Trematoda: Alariidae). *Trans Am Microscop Soc.* 1939;58:49-61.
- Walters JC, Freeman RS, Shea M, Fallis AM. Penetration and survival of mesocercariae (*Alaria* spp.) in the mammalian eye. *Can J Ophthalmol.* 1975;10(1):101-6.
- Warkentin IG, Bickford D, Sodhi NS, Bradshaw CJA. Eating Frogs to Extinction. *Conservation Biology.* 2009;23(4):1056-9.

Waterman, S. R. & Small, P. L. C. 1998, "Acid-sensitive Enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources", *Applied and Environmental Microbiology* pp. 3882-3886.

Weir, S. C., Pokorny, N. J., Carreno, R. A., Trevors, J. T., & Lee, H. 2002, "Efficacy of Common Laboratory Disinfectants on the Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Cell Culture", *Applied and Environmental Microbiology* pp. 2576-2579.

Willach P. Distomenbrut in den Lungen des Pferdes. Arch wiss prakt Tierhk. 1892;18:118-23.

Willach P. Distomenbrut im Muskelfleische eines Bullen. Arch wiss prakt Tierhk. 1892;18:239-42.

WISIA. Artenschutzdatenbank des Bundesamtes für Naturschutz in Bonn. 2010 (zitiert vom 14.05.2012) < <http://www.wisia.de/FsetWisial.de.html>>

Wittrock DD, Ulmer MJ. Helminths of badgers, Taxidae taxus (Schreber), in northwest Iowa. Iowa St J Res. 1974;48:319-27.

Wojcik AR, Franckiewicz-Grygon B, Zbikowska E. [The studies of the invasion of *Alaria alata* (Goeze,1782) in the Province of Kuyavia and Pomerania]. Wiad Parazytol. 2001;47(3):423-6.

Wolfe A, Hogan S, Maguire D, Fitzpatrick C, Vaughan L, Wall D et al. Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Ireland as hosts for parasites of potential zoonotic and veterinary significance. Veterinary Record. 2001;149(25):759-63.

WWF. Hintergrundinformation: Globale Amphibienkrise. 2006 (zitiert vom 14.05.2012):1-6 < http://www.wwf.de/fileadmin/fm-wwf/Publikationen-PDF/HG_Globale_Amphibienkrise_12_01.pdf>

Zhu, H., Hart, C. A., Sales, D., & Roberts, N. B. 2006, "Bacterial killing in gastric juice - effect of pH and pepsin on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*", *Journal of Medical Microbiology*, vol. 55, pp. 1265-1270.

Zimmerman, W. J. 1971, "Salt cure and drying-time and temperature effects on viability of *Trichinella spiralis* in dry-cured hams", *Journal of Food Science*, vol. 36, pp. 58-62.

Danksagungen

Das Forschungsprojekt „Untersuchungen zur Prävalenz des Duncker’schen Muskelegels in Wildtierpopulationen“ (FKZ 2808HS017) wird mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) gefördert. Unser Dank gilt weiterhin Frau Lia Kieker, Herrn Heiko Wellner sowie Herrn Lutz Gumpert für die technische Mitarbeit. Für die wissenschaftliche Begleitung des Ringversuchs möchten wir uns bei Herrn PD Dr. Karsten Nöckler (BfR Berlin) sowie den Dres. Dirk Hascenclever und David Petroff (IMISE Leipzig) noch einmal recht herzlich bedanken.

Wir möchten an dieser Stelle allen Ringversuchsteilnehmern für ihre Teilnahme und engagierte Mitarbeit danken.

Südost Fleisch GmbH/ Abt. Veterinärwesen, Am Poschwitzer Park 7, 04600 Altenburg

Kreis Herzogtum Lauenburg Fachdienst Veterinärwesen und Lebensmittelüberwachung,

Schmilauer Str. 66, 23879 Mölln

Fleischhygieneamt Kellinghusen, Neuer Kamp 1, 25548 Kellinghusen

Landkreis Salzland, Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt, Böttcherstr. 24a, 39218 Schönebeck

Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Burgenlandkreis, Am Schlachthof 8a, 06667 Weißenfels

Landkreis Harz, Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung, Friedrich-Ebert-Str. 40, 38820 Halberstadt

Stadt Görlitz Lebensmittelüberwachungs- und Veterinäramt, Georgewitzer Str. 58, 02708 Löbau

Veterinär- und Lebensmittelaufsichtsamt Leipzig, Theodor-Heuss-Str. 43, 04328 Leipzig

Stadt Dessau-Roßlau Dezernat V Gesundheitsamt/Veterinärwesen und Verbraucherschutz, Wallstr. 21, 06844 Dessau

AGES Österreichische Agentur Gesundheit/ Ernährungssicherheit, Techniker Str. 70, A-6020 Innsbruck

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Wupper, Deutscher Ring 100, 47798 Krefeld

Landkreis Diepholz, Fachdienst 39 Verbraucherschutz & Veterinärwesen, Grafenstr. 3, 49356

Diepholz

Landkreis Gifhorn Veterinärwesen, Schlossplatz 1, 38518 Gifhorn

Stadt Wolfsburg Veterinäramt, Dieselstr. 18a, 38446 Wolfsburg

Landkreis Uecker-Randow Fachdienst Veterinärwesen und Lebensmittelüberwachung, An der
Kürassierkaserne 9, 17903 Pasewalk

Gemeinde Höhenland, Haupstr. 30a, 15320 Neu-Trebbin

Landkreis Potsdam-Mittelmark Fachbereich Umwelt, Landwirtschaft und Verbraucherschutz Fach-
dienst 32, Potsdamer Str. 18, 14776 Brandenburg/ Havel

Bundesinstitut für Risikobewertung, Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin

Schlachthof Bamberg, Lichtenhaide Str. 1, 96052 Bamberg

Städtisches Veterinäramt Hof, Bürgerstr. 18, 95028 Hof

Staatl. Tierärztliches Untersuchungsamt Aulendorf, Löwenbreitstr. 18/20, 88326 Aulendorf

6 Anlagen

6.1 Unterlagen zur Durchführung des Ringversuchs

6.2 Veröffentlichung “*Alaria alata* in wild boars (*Sus scrofa*, *Linnaeus*, 1758) in the eastern parts of Germany”

6.3 Veröffentlichung First detection of *Alaria alata* mesocercariae in a wild boar (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) in Bulgaria

6.4 *Alaria alata* mesocercariae in raccoons (*Procyon lotor*) in Germany

6.5 Tenacity of *Alaria* spp. mesocercariae isolates in different home-made German meat products

6.6 First interlaboratory test for the detection of *Alaria* spp. mesocercariae in meat samples using the *Alaria* spp. mesocercariae migration technique (AMT)

6.7 Development of a PCR approach for differentiation of *Alaria* spp. mesocercariae

6.8 Durchführung eines Ringversuches zur Validierung der *Alaria alata* mesocercariae migration technique (AMT)