

Vorkommen von *Trichinella* spp. beim Wildschwein in der Schweiz

C. F. Frey¹, M. E. Schuppers², V. Eidam¹, P. Boujon³, A. Waldvogel³, B. Gottstein¹

¹Institut für Parasitologie, Universität Bern, ²SAFOSO, Bern, ³Institut Galli-Valerio, Lausanne

Zusammenfassung

Die Trichinellose ist eine weltweit verbreitete Zoonose, die durch den intrazellulären Nematoden *Trichinella* spp. verursacht wird. Eine Hauptinfektionsquelle in Europa ist rohes oder ungenügend gekochtes Wildschweinefleisch. Da in der Schweiz *Trichinella britovi* bei Wildkarnivoren vorkommt, ist ein Miteinbezug des Wildschweines in diesen Wildtierzyklus nicht auszuschliessen. Um die Prävalenz der Trichinelleninfektionen bei Wildschweinen abschätzen zu können, haben wir insgesamt 1'458 Wildschweine parasitologisch und serologisch untersucht. Mittels künstlicher Verdauung konnten bei keinem der Tiere Larven nachgewiesen werden (Larvenprävalenz von 0%; 95% CI 0.0–0.3). Der Antikörpernachweis im Fleischsaft mittels eines standardisierten E/S-Ag-ELISA war in 57 Proben positiv. Im Bestätigungstest (Westernblot) blieben jedoch nur 3 Proben positiv (Seroprävalenz von 0.2%; 95% CI 0.07%–0.60%). Die Nachweisbarkeit von anti-*Trichinella*-Antikörpern bei Wildschweinen macht deutlich, dass die Untersuchung dieser Tierart auf *Trichinella*-Larven weiterhin gerechtfertigt ist, um Humaninfektionen vorzubeugen.

Schlüsselwörter: *Trichinella*, Wildschwein, Seroprävalenz, ELISA, Westernblot

Occurrence of *Trichinella* spp. in wild boar in Switzerland

Trichinellosis is a worldwide occurring zoonosis caused by the intracellular nematode *Trichinella* spp. One of the main infection sources in Europe is raw or undercooked meat from wild boar. *Trichinella britovi* is prevalent in wild carnivores in Switzerland, thus a possible inclusion of wild boar in this wildlife cycle cannot be excluded. In order to assess the prevalence of *Trichinella* infection in wild boar, we tested 1'458 animals with both parasitological and serological methods. In none of the animals *Trichinella*-larvae could be recovered by the artificial digestion method (prevalence of larvae: 0%; 95% CI 0.0–0.3). Antibodies in meat juice were detected in 57 animals using a standardized E/S-Ag-ELISA. However, in the confirmatory westernblot, only 3 animals remained seropositive (seroprevalence: 0.2%; 95% CI 0.07%–0.60%). The occurrence of wild boar positive for anti-*Trichinella*-antibodies indicates that meat inspection for *Trichinella*-larvae in this species is important to prevent human infections.

Keywords: *Trichinella*, wild boar, seroprevalence, ELISA, westernblot

Einleitung

Der parasitäre Nematode *Trichinella* spp. kommt bei vielen karni- und omnivoren Tierarten vor. Eine Infektion des Menschen über rohe oder ungenügend gekochte Muskulatur, welche infektiöse *Trichinella*-Larven enthält, kann zu einer schweren, teilweise sogar lebensbedrohlichen Erkrankung führen. Hauptinfektionsquellen für den Menschen in Europa sind Hausschweine sowie Pferde und Wildschweine (Pozio, 1998; Kociecka, 2000; EFSA, 2005; O.I.E. manual, 2008). In der Schweiz sind *Trichinella*-Larven bei Hausschweinen und Pferden seit über einem Jahrhundert und bei Wildschweinen (*Sus scrofa*) seit mehreren Jahrzehnten nicht mehr gefunden

worden (Hörning, 1968, 1976; Vanzetti, 1982; Jakob et al., 1994; Gottstein et al., 1997). Jedoch konnten immer wieder Larven aus Füchsen (*Vulpes vulpes*) und Luchsen (*Lynx lynx*) isoliert werden. Die jüngste Studie zum Vorkommen von *Trichinella*-Larven bei Wildkarnivoren ergab eine Prävalenz von 1.6% bei Füchsen und von 27.3% bei Luchsen (Frey et al., 2009a). Somit kommen in der Schweizer Wildtierpopulation Trichinellen der Spezies *T. britovi* vor, die Schweiz gilt aber nach wie vor als frei von *T. spiralis*.

Im Unterschied zur Schweiz, wo seit langem keine *Trichinella*-Larven beim Wildschwein nachgewiesen werden konnten, sind in unseren Nachbarländern Deutschland, Frankreich und Italien Trichinellen-Funde beim Wild-

486 Originalarbeiten

schwein zwar selten, aber sie kommen immer wieder vor (Nöckler, 2005; Pozio et al., 2008). Auch in Österreich wurde kürzlich ein Larven-positives Wildschwein gefunden (Pozio et al., 2008). In der Schweiz bestehen zumindest Hinweise darauf, dass sich Wildschweine mit *Trichinella* spp. infizieren können, hat doch eine serologische Untersuchung von 356 Wildschweinen mittels ELISA das Vorkommen von Antikörpern in 8.7 % der untersuchten Tiere zeigen können (Gottstein et al., 1997).

Die serologische Untersuchung mittels E/S-ELISA hat eine hohe Sensitivität, jedoch können falsch-positive Resultate vorkommen (Gamble et al., 1983). Dies kann zu einer Überschätzung der wirklichen Seroprävalenz und damit zu einer Überschätzung der Verbreitung der Infektion führen. ELISA-positive Ergebnisse sollten deshalb mit einem Bestätigungstest überprüft werden. Am Institut für Parasitologie in Bern (IPB) wurde kürzlich ein Westernblot als Bestätigungstest für Trichinelleninfektion bei Hausschweinen validiert (Frey et al., 2009b). Die serodiagnostische Strategie, den suiden ELISA-Screening-Test mit dem Westernblot als Bestätigungstest zu ergänzen, wurde nun auch beim Wildschwein angewendet.

Tiere, Material und Methoden

Wildschweine

Insgesamt wurden 1'458 Zwerchfellproben von Wildschweinen, welche in den Jahren 2005 bis 2007 gesammelt wurden, untersucht. Davon fielen 1'108 Proben auf Tiere, die zur amtlichen Untersuchung auf Trichinellen an das Institut für Parasitologie in Bern (IPB) geschickt wurden. Von 350 weiteren Proben, die am Institut Galli-Valerio (Lausanne) mittels künstlicher Verdauung analysiert wurden, gelangte direkt Fleischsaft ans IPB. Alle IPB-Proben waren begleitet vom offiziellen Antragsformular des IPB, aus welchem der Wohnort des Einsenders sowie, falls ausgefüllt, die Alterskategorie (juvenil < 12 Monate, subadult 1–2 Jahre, adult > 2 Jahre) und das Geschlecht der Wildschweine hervorgingen. Die Alterskategorie wurde von den Jägern aufgrund der Körpergrösse der erlegten Tiere sowie der Saison, in der sie erlegt wurden, geschätzt. Zu den Fleischsaftproben aus Lausanne erhielten wir Angaben zum Wohnort des jeweiligen Jägers. Bei der Probeerhebung wurde darauf geachtet, Jäger aus der ganzen Schweiz zu berücksichtigen. Der genaue Abschussort der Wildschweine war aus den Dokumenten nicht ersichtlich, wohl aber, dass die Tiere ausnahmslos aus der Schweiz stammten.

Larvennachweis

Von jeder Zwerchfellprobe wurden mindestens 5 Gramm in einem gepoolten Ansatz von maximal 10 Tieren (d.h. maximal 50 Gramm pro Ansatz) mittels künstlicher Ver-

dauungsmethode mit dem Magnetrührverfahren analog des Anhangs I der EU-Richtlinie (EG) No. 2075/2005 untersucht.

Antikörper-Nachweis

Vom Rest jeder Zwerchfellprobe, der nicht für den Larvennachweis verwendet wurde, konnte durch Frieren-Tauen Fleischsaft gewonnen (Kapel et al., 1998) und darin mittels E/S-Ag-ELISA (Frey et al., 2009b) anti-*Trichinella*-Antikörper bestimmt werden. Die beschichteten Platten sowie die Positiv- und Negativkontrollen (Seren von experimentell infizierten Schweinen) wurden uns von Dr. Nöckler, BfR, Berlin, überlassen. Der Schwellenwert für eine positive Probe wurde bei 23 % des Absorptionwertes der Positivkontrolle festgelegt. Dieser Wert wurde aus der Validierung beim Hausschwein übernommen (Frey et al., 2009b). Jede Fleischsaftprobe, welche im ELISA ein positives Resultat lieferte, wurde anschliessend in einem ebenfalls für das Hausschwein validierten Westernblot nachgeprüft (Frey et al., 2009b), wobei dieselben Kriterien (Bandenmuster bestehend aus mehreren, definierten Banden) zur Abklärung der Spezifität verwendet wurden.

Statistik

Die Daten wurden über eine Excel-Datenbank zur Auswertung in eine Access-Datenbank übertragen. Korrelationen zwischen den Parametern wurden mit einem Chi-Quadrat-Test geprüft. Die Signifikanz von Prävalenzunterschieden wurde mit einem 2-seitigen Fisher's Exact test (NCSS 2007, Kaysville, Utah, USA) untersucht. Die Signifikanzschwelle wurde bei $p < 0.05$ festgelegt.

Ergebnisse

Angaben zum Geschlecht erhielten wir von 46 % der Tiere, Angaben zum Alter von 44 % der untersuchten Wildschweine. Davon waren 52 % männliche und 48 % weibliche Tiere und die Altersverteilung der untersuchten Wildschweine betrug 10 % juvenil, 59 % subadult und 31 % adult (Tab. 1).

Larvennachweis

Da bei keiner einzigen Probe Larven nachgewiesen werden konnten, betrug die Prävalenz 0 % (95 % CI 0.0–0.3 %).

ELISA

Von 1'458 Zwerchfellproben konnten Fleischsaft gewonnen werden und in 57 (3.9%; 95 % CI 3.03–5.03 %) Proben mittels ELISA anti-*Trichinella*-Antikörper nachgewiesen werden.

Tabelle 1: Beschreibung der untersuchten Wildschweine.

Alter	Geschlecht			Total
	Männlich	Weiblich	Unbekannt	
< 1 Jahr	34	23	8	65
1–2 Jahre	177	166	41	384
> 2 Jahre	100	81	18	199
Unbekannt	37	56	717	810
Total	348	326	784	1458

Westernblot

Die 57 ELISA-positiven Proben wurden im Westernblot überprüft. Dabei zeigten nur 3 Proben das diagnostisch relevante Bandenmuster (Abb. 1). Bei einigen weiteren Proben trat nur eine unspezifische Bande auf. Diese Proben wurden entsprechend als seronegativ klassifiziert. Somit betrug die Seroprävalenz von anti-*Trichinella*-Antikörpern bei Wildschweinen in der Schweiz 0.2% (95% CI 0.07%–0.60%).

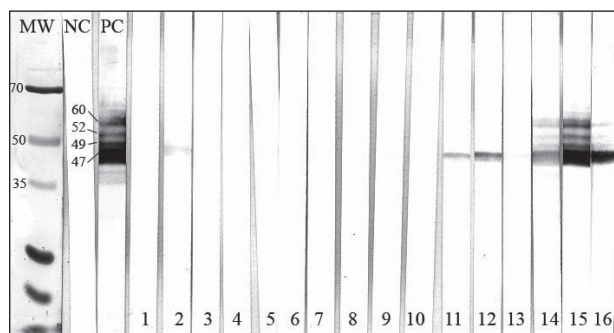


Abbildung 1: Westernblot zum Nachweis von anti-*Trichinella*-Antikörpern aus dem Fleischsaft von Wildschweinen. MW: Molekulargewichtsmarker; NC: Negativkontrolle; PC: Positivkontrolle; Streifen 1–13: negative Fleischsaftproben, zum Teil mit unspezifischen Reaktionen (Streifen 2, 11, 12); Streifen 14–16: positive Fleischsaftproben.

Risikofaktoren

Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einem positiven Resultat im ELISA und dem Geschlecht oder der Alterskategorie der Tiere festgestellt werden.

Diskussion

Eine Studie aus dem Jahr 1997 (Gottstein et al., 1997) fand unter Verwendung desselben E/S-Ag-ELISA eine Seroprävalenz beim Wildschwein von 8.7% (95% CI 6.2–12.1). Da zu diesem Zeitpunkt noch kein entsprechender Westernblot zur Verfügung stand, konnten falsch-positive ELISA-Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Mit dem

für das Hausschwein validierten Westernblot (Frey et al., 2009b) hatten wir neu die Möglichkeit, die Seroprävalenz auch beim Wildschwein genauer zu spezifizieren. Als Screening-Test setzten wir den ELISA ein und erhielten hiermit ein ELISA-positives Ergebnis von 3.9% (95% CI 3.03–5.03%). Die Überprüfung dieses provisorischen Befundes mittels Westernblot ergab eine Seroprävalenz von 0.2% (95% CI 0.07–0.6). Diese Prävalenz fiel signifikant niedriger aus als die frühere Schätzung von 8.7% ($p < 0.0001$). Auch wenn die ELISA-Ergebnisse unserer Studie direkt mit den früheren ELISA-Ergebnissen verglichen werden (3.9% versus 8.7%), besteht immer noch ein statistisch signifikanter Rückgang von ELISA-positiven Proben ($p = 0.0003$). Somit können wir vorsichtig von einem Rückgang der *Trichinella*-Seroprävalenz beim Wildschwein in den letzten 10 Jahren sprechen.

Da in der Wildtierpopulation in der Schweiz bisher nur *Trichinella britovi* gefunden wurde (Gottstein et al. 1997; Frey et al., 2009a), ist die Wahrscheinlichkeit gross, dass die beim Wildschwein nachgewiesene Immunantwort durch diese Art hervorgerufen wurde. *T. britovi* kommt vor allem im Wildtierzyklus vor und ist sehr gut an Karnivoren angepasst. Das Hauptreservoir dieser Trichinenart in Europa ist der Fuchs (Gottstein et al., 2009). Infektionsversuche mit *T. britovi* beim Hausschwein haben gezeigt, dass die Infektionsintensität beim Schwein sehr tief ist, das heisst dass nur geringe Larvendichten erreicht werden (Kapel et al., 1998). Eine niedrige Infektionsintensität von *T. britovi* beim Wildschwein könnte dazu führen, dass zwar eine Immunantwort mit nachweisbaren Antikörpern stattfindet, dass aber die Larven mit der konventionellen Verdauungsmethode aufgrund von methodischer Sensitivitätseinschränkung nicht gefunden werden können.

Die Verdauungsmethode hat beim Hausschwein beim Einsatz von 5 Gramm Fleisch pro Untersuchung eine Nachweisgrenze von mindestens einer Larve pro Gramm (LpG) Fleisch (Gamble, 1996; Forbes und Gajadhar, 1999). Wenn die Infektionsdichte tiefer ist, nimmt auch die Wahrscheinlichkeit ab, Larven zu finden.

Für Deutschland, wo jährlich bis zu einer halben Million Wildschweine erlegt und davon ca. 75% auf Larvenbefall untersucht werden, ergab sich bisher eine *Trichinella*-Prävalenz von 0.001–0.01% (Nöckler, 2005). Die Genotypisierung ergab fast ausschliesslich *T. spiralis* Larven

488 Originalarbeiten

(Nöckler, 2005; Pozio et al., 2008). Das Vorkommen von *T. spiralis* in der Wildtierpopulation in Deutschland ist auch für die Schweizer Wildschweinpopulation relevant, da *T. spiralis* im Gegensatz zu *T. britovi* sehr gut an Schweine angepasst ist und eine Infektion auch zu einem höheren Larvenbefall führen kann (Kapel et al., 1998). Die Wahrscheinlichkeit einer Humaninfektion nimmt mit der Anzahl aufgenommener Larven zu (Gottstein et al., 2009), und aus diesem Grund ist *T. spiralis* auch aus lebensmittelhygienischer Sicht sehr relevant. Eine konsequente Genotypisierung von Trichinellenlarven, die bei Wildtieren isoliert worden sind, ist deshalb wichtig, um ein Vorkommen von *T. spiralis* in der Schweiz rechtzeitig zu entdecken beziehungsweise auszuschliessen. Obwohl auch in dieser Studie bei keinem der Wildschweine *Tri-*

chinella-Larven gefunden wurden, zeigt die Seroprävalenz von 0.2% (95% CI 0.07%–0.60%), dass für Wildschweine ein gewisses Risiko besteht, mit *Trichinella* spp. in Kontakt zu kommen. Die Untersuchung von Wildschweinen auf *Trichinella*-Larven ist deshalb weiterhin gerechtfertigt, insbesondere um potenziellen Infektionen beim Konsumenten vorzubeugen.

Dank

Wir bedanken uns bei Gertrud Rosenberg, Ramona Graf, Philipp Stünzi, Caroline Müller, Christine Wittwer und Trang Nguyen für die wertvolle technische Unterstützung im Labor.

Présence de *Trichinella* spp. chez les sangliers en Suisse

La Trichinellose est une zoonose répandue mondialement, causée par des nématodes intracellulaires de l'espèce *Trichinella*. Une source d'infection principale en Europe est la viande de sanglier consommée crue ou insuffisamment cuite. Dans la mesure où en Suisse *Trichinella britovi* survient chez les carnivores sauvages, une implication du sanglier dans ce cycle auprès des animaux sauvages ne peut être exclue. Pour pouvoir estimer la prévalence des infections à trichines chez les sangliers, nous avons examiné au total 1'458 sangliers du point de vue parasitologique et sérologique. Chez aucun de ces animaux des larves n'ont pu être mis en évidence par une digestion artificielle (prévalence de larves 0%; 95% CI 0,0–0,3). La mise en évidence d'anticorps dans le jus de viande au moyen d'un test ELISA standardisé a été positive dans 57 cas. Dans le test de confirmation (Westernblot), seuls 3 échantillons sont restés positifs (séroprevalence de 0,2%; 95% CI 0,07%–0,60%). Le fait que l'on puisse trouver des anticorps dirigés contre les trichines chez les sangliers montre clairement que l'examen de ces animaux quant à la présence de larves de trichine reste justifié pour prévenir des infections humaines.

Presenza di *Trichinella* spp. nei cinghiali in Svizzera

La trichinellosi (detta anche trichinosi) è una zoonosi diffusa in tutto il mondo e causata da un nematode intracellulare: la *Trichinella* spp.. Un'importante fonte di infezione in Europa è l'assimilazione di carne di cinghiale cruda o poco cotta. In Svizzera la *Trichinella britovi* si presenta nei carnivori selvatici e non si può escludere che i cinghiali possano appartenere a questo ciclo di animali selvatici. Per stimare la prevalenza dell'infezione da *trichinella* nei cinghiali abbiamo studiato in totale 1'458 cinghiali con test parasitologici e sierologici. Per mezzo di una digestione artificiale non si sono riscontrate larve in alcun animale (prevalenza delle larve da 0%; 95% CI 0.0–0.3). Sono risultati positivi al test standardizzato ELISA E/S-Ag 57 campioni; nel loro liquido della carne si sono rilevati degli anticorpi. Nel test di conferma (Western blot) sono rimasti però 3 campioni positivi (sieroprevalenza di 0.2%; 95% CI 0.07%–0.60%). L'individuazione di anticorpi anti-*Trichinella* nei cinghiali dimostra chiaramente che l'esame delle larve di *Trichinella* in questa specie è pienamente giustificato per prevenire l'infezione nell'uomo.

Literatur

European Food Safety Authority. Risk assessment of a revised inspection of slaughter animals in areas with low prevalence of *Trichinella* (http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/biohaz-ej200-op-trichinella-en%20vf.pdf?ssbinary=true). 2005, accessed 6 January 2009.

Forbes L. B., Gadjadhar A. A.: A validated *Trichinella* digestion assay and an associated sampling and quality assurance sys-

tem for use in testing pork and horse meat. J. Food Prot. 1999, 62:1308–1313.

Frey C.F., Schuppers M.E., Müller N., Ryser-Degiorgis M.-P., Gottstein B.: Assessment of the prevalence of *Trichinella* spp. in red foxes and Eurasian lynxes from Switzerland. Vet. Parasitol. 2009a, 159: 295–299.

Frey C.F., Schuppers M.E., Nöckler K., Marinculic A., Pozio E., Kihm U., Gottstein B.: Validation of a Western blot for the detec-

tion of anti-*Trichinella* spp. antibodies in domestic pigs. Parasitol. Res. 2009b, Epub ahead of print

Gamble H.R., Anderson W.R., Graham C.E., Murrell K.D.: Serodiagnosis of swine trichinosis using an excretory-secretory antigen. Vet. Parasitol. 1983, 13: 349–361.

Gamble H.R.: Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. J. Food Prot. 1996, 59: 295–298.

Gottstein B., Pozio E., Connolly B., Gamble H.R., Eckert J., Jakob H.P.: Epidemiological investigation of trichinellosis in Switzerland. Vet. Parasitol. 1997, 72: 201–207.

Gottstein B., Pozio E., Nöckler K.: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. Clin. Microbiol. Rev. 2009, 22: 127–145.

Hörning B.: Zur Naturherd-Problematik der Trichinellose in der Schweiz. Revue Suisse de Zoologie. 1968, 75: 1063–1066.

Hörning B.: *Trichinella spiralis* und Trichinellose in der Schweiz. Hausdruckerei Institut für exakte Wissenschaften, Bern, 1976.

Jakob H.P., Eckert J., Jemmi T., Gottstein B.: Untersuchungen von Schlacht- und Wildtieren in der Schweiz auf Trichinellose mit der Verdauungsmethode und einem serologischen Verfahren (E/S-ELISA). Schweiz. Arch. Tierheilkd. 1994, 136: 298–308.

Kapel C.M., Webster P., Lind P., Pozio E., Henriksen S.A., Murrell K.D., Nansen P.: *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, and *T. nativa*: infectivity, larval distribution in muscle, and antibody response after experimental infection of pigs. Parasitol. Res. 1998, 84: 264–271.

Kociecka W.: Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. Vet. Parasitol. 2000, 93: 365–383.

Nöckler K.: Vorkommen und Bedeutung von *Trichinella* spp. in Deutschland. Wien. Tierärztl. Mschr. 2005, 92: 301–307.

Pozio E.: Trichinellosis in the European Union: Epidemiology, Ecology and Economic Impact. Parasitol. Today 1998, 14: 35–38.

Pozio E., Rinaldi L., Marucci G., Musella V., Galati F., Cringoli G., Boireau P., La Rosa G.: Hosts and habitats of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Europe. Vet. Parasitol. 2008, 39: 71–79.

Vanzetti T.: Indagine epidemiologica sulla trichinellosi nel canton Ticino. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1982, 124: 349–357.

World Organisation for Animal Health: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 2.1.16 Trichinellosis. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.01.16_TRICHINELLOSIS.pdf. 2008, accessed 30 September 2008.

Korrespondenz

Caroline Frey
Institut für Parasitologie,
Vetsuisse Fakultät, Universität Bern
Postfach 8466
3001 Bern
Email: caroline.frey@ipa.unibe.ch

Manuskripteingang: 17. Februar 2008
Angenommen: 27. März 2009