

Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln¹, Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin und Institut für Tierernährung und funktionelle Pflanzenstoffe², Department/Universitätsklinik für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Veterinärmedizinische Universität Wien

Mikrobiologische Qualität von Muskelgewebe vom Rind zur Rohverfütterung an Hunde

J. KOCH¹, G. FLEKNA¹, Ch. IBEN², F.J.M. SMULDERS¹ und P. PAULSEN^{1*}

eingelangt am 14. Oktober 2019
angenommen am 10. Februar 2020

Schlüsselwörter: BARF, Rindfleisch, Mikrobiologie, *Salmonella*, *Listeria*.

Keywords: BARF, beef, microbiology, *Salmonella*, *Listeria*.

■ Zusammenfassung

In dieser Studie wurde die mikrobiologische Qualität von tiefgekühlten Futtermitteln aus Rindermuskulatur zur Rohfütterung für Hunde untersucht. Im Herbst 2018 wurden 96 verschiedene Erzeugnisse (Kopffleisch, n = 41; Kehl- und Halsfleisch, n = 19; sonstige Muskulatur, n = 36) aus 20 Fachgeschäften in Wien bezogen und mit konventionellen kulturellen Verfahren untersucht.

Die aerobe mesophile Keimzahl aller Proben betrug $7,6 \pm 1,1 \log_{10}$ KbE/g. Für *Pseudomonas* spp., Milchsäurebakterien und koagulase-negative Staphylokokken wurden Konzentrationen von $7,0 \pm 1,5$; $5,7 \pm 1,0$ bzw. $4,0 \pm 0,8 \log_{10}$ KbE/g ermittelt. Die Untersuchung der Proben auf Enterobacteriaceen und *E. coli* ergab Mittelwerte von $4,9 \pm 1,1 \log_{10}$ KbE/g bzw. von $3,0 \pm 1,3 \log_{10}$ KbE/g. *Salmonella* spp. wurden in sieben von 96 Proben (7,3 %) nachgewiesen (in jeweils 25 g), es handelte sich um *S. Typhimurium* (3 x), je ein Isolat von *S. London*, *S. Senftenberg*, *S. Coeln* und ein monophasisches

■ Summary

Microbiological condition of bovine muscle tissues intended for raw-feeding of dogs

Introduction

Feeding raw meats and slaughter by-products to dogs ('BARF') is often regarded as a 'natural' way of nutrition. Several studies provide evidence that such raw diets frequently contain pathogenic bacteria and thus could act as a source of infection not only for animals but also for humans handling such feedstuff. We present an investigation of the microbiological condition of frozen raw meat for feeding to dogs.

Material and Methods

In autumn 2018, 96 different products were purchased from 20 pet food shops in Vienna (one packaging unit per product). Samples were exclusively bovine muscle products. Eighty-nine samples could be assigned to ten manufacturers. Seven products were sold without labels. The products were assigned to the groups 'head

meat' (n = 41), 'throat and neck meat' (n = 19) and 'other muscles' (n = 36). The samples were thawed overnight at +2 °C and examined by conventional cultural microbiological methods.

Results

The average aerobic mesophilic microbial count for the 96 samples was $7.6 \pm 1.1 \log \text{ cfu/g}$. The average levels of *Pseudomonas* spp., lactic acid bacteria and coagulase-negative staphylococci were $7.0 \pm 1.5 \log \text{ cfu/g}$; $5.7 \pm 1.0 \log \text{ cfu/g}$ and $4.0 \pm 0.8 \log \text{ cfu/g}$, respectively. Examination of the samples for Enterobacteriaceae and *E. coli* revealed mean values of $4.9 \pm 1.1 \log \text{ cfu/g}$ and $3.0 \pm 1.3 \log \text{ cfu/g}$, respectively.

The presence of pathogenic bacteria was assessed in 25 g aliquots. *Salmonella* spp. were detected in seven of the 96 samples (7.3 %): three isolates were *S. Typhimurium* and there was one isolate each of *S. London*, *S. Senftenberg*, *S. Coeln* and a monophasic isolate of group E1. Five of the seven positive samples were from the group 'head meat' and two from 'throat

*E-Mail: peter.paulsen@vetmeduni.ac.at

Isolat aus der Gruppe E1. Fünf Isolate waren der Gruppe „Kopffleisch“ und 2 Isolate der Gruppe „Kehl- und Halsfleisch“ zuzuordnen. *Campylobacter* spp. wurden in keiner Probe nachgewiesen. *Listeria monocytogenes* wurde in zehn von 96 Proben nachgewiesen (10,4 %; fünf in „Kopffleisch“, vier in „sonstiger Muskulatur“ und eine in „Kehl- und Halsfleisch“). Die VO (EG) Nr. 142/2011 sieht für rohes Heimtierfutter mikrobiologische Kriterien für Enterobacteriaceen und Salmonellen vor. Diese gelten zwar bei der Herstellung und Lagerung vor dem Versand, da die Produkte aber tiefgekühlt angeboten wurden, erscheint es gerechtfertigt, die Grenzwerte der Verordnung für eine Beurteilung der Proben zu verwenden. Demnach erfüllten sieben von 96 Proben (7,3 %) das *Salmonella*-Kriterium (nicht nachweisbar in 25 g) nicht, und 82 von 96 Proben (85,4 %) das Enterobacteriaceen-Kriterium (≤ 5000 KbE/g) nicht.

In Verbindung mit dem übrigen mikrobiologischen Profil wird das Potential von rohem Heimtierfutter als Quelle für Infektionen mit humanpathogenen Erregern deutlich und generell zeigt sich ein Verbesserungsbedarf der Produkthygiene.

■ Einleitung

Haustiere haben in der heutigen Gesellschaft einen hohen Stellenwert, besonders die Haltung von Hunden und Katzen ist sehr beliebt. Die Federation Cynologique Internationale (FCI) schätzte die österreichische Hundepopulation durch Befragungen nationaler Hundeverbände, welche FCI-Mitglieder sind, im Jahr 2018 auf 665.000 Tiere (FCI, 2019). Für Wien wurde zum Stichtag 01.09.2017 die Zahl der gemeldeten Hunde mit 55.705 angegeben, die Dunkelziffer wird weit höher geschätzt (MAGISTRAT DER STADT WIEN, 2019).

Das Interesse der Tierhalterinnen und Tierhalter an selbst zusammengestellten, selbst gekochten oder rohen Rationen ist gestiegen (MICHEL, 2006). Die Verfütterung von rohem Muskelfleisch oder rohen inneren Organen (im Folgenden unter dem Begriff „Rohfleisch“ bzw. „Fleisch“ zusammengefasst), das sog. „BARFen“, wird von Tierhalterinnen und Tierhaltern oft als „natürliche“ Ernährungsweise angesehen (MORGAN et al., 2017). Überprüfte Rohfleischrationen sind jedoch fast immer in der Nährstoffzusammensetzung und somit der Bedarfsdeckung mangelhaft (ZIMMERMANN, 2013). Außerdem kann durch die mikrobiologische Beschaffenheit dieser Rohfleischprodukte die Gesundheit von Hunden und Menschen negativ beeinflusst werden (JOFFE u. SCHLESINGER, 2002; STROHMEYER et al., 2006; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2017). Rohfleischprodukte in BARF-Rationen können neben grundsätzlich genusstauglichen Schlachtnebenprodukten auch Teile beinhalten, welche nicht für den menschlichen Verzehr bestimmt sind (z.B.

and neck meat'. *Campylobacter* spp. were not detected in any sample and *Listeria monocytogenes* was detected in ten of the 96 samples (10.4 %: five in 'head meat', four in 'other muscles' and one in 'throat and neck meat').

Conclusions

Regulation (EC) No 142/2011 provides microbiological criteria for feed with respect to Enterobacteriaceae and *Salmonella*; these criteria are applicable during manufacture and storage prior to placing on the market. However, as the products were offered deep-frozen, we decided to apply the limits of the regulation for the evaluation of the samples. Seven of the 96 (7.3 %) samples did not meet the *Salmonella* criterion, and 82 of 96 (85.4 %) did not meet the Enterobacteriaceae criterion (≤ 5000 cfu/g).

Along with the general microbiological profile, there is a need for hygiene improvements for these products. Considering the increasing interest in BARF feeding in Europe, the role of raw pet food as a potential source of infection with human pathogens and implications for public health needs further investigation.

Muskulatur von der Stichstelle, Kehlkopf; DAVIES et al., 2019). Diese Produkte haben ein erhöhtes Risiko, mikrobiologisch nicht einwandfrei zu sein (STROHMEYER et al., 2006; VAN BREE et al., 2018). Der Umgang mit (Haus-)Tieren, die *Campylobacter* ausscheiden, ist ein Risikofaktor für humane *Campylobacteriose* (ADAK et al., 1995; NEIMANN et al., 2003; CARRIQUE-MAS et al., 2005; STAFFORD et al., 2008; BUETTNER et al., 2010). Sowohl streunende als auch gehaltene Hunde können *Campylobacter* ausscheiden (WIELAND et al., 2005; GIACOMELLI et al., 2015; HOLMBERG et al., 2015; PÖLZLER et al., 2018). Dieses Pathogen konnte auch in Kotproben von Hunden und dem verfütterten Rohfleisch nachgewiesen werden (BOJANIC et al., 2017). Rohes Fleisch zur Verfütterung an Hunde kann mit Salmonellen kontaminiert sein (CHENGAPPA et al., 1993; FINLEY et al., 2008; NEMSER et al., 2014; HELLGREN et al., 2019). Die Verfütterung kann Hunde (STONE et al., 1993; FINLEY et al., 2007; LEFEBVRE et al., 2008) oder Katzen (STIVER et al., 2003; GIACOMETTI et al., 2017) zu Ausscheidern machen. Salmonellen können auch auf Gegenständen oder in getrockneten Futtermitteln persistieren (PITOUT et al., 2003; WEESE u. ROUSSEAU, 2006), sodass sich insgesamt ein nicht vernachlässigbares Risiko für humane Infektionen ergibt (JOFFE u. SCHLESINGER, 2002).

Zur Rohverfütterung vorgesehene tierische Gewebe können daher nicht nur für die Haustiere (FREEMAN u. MICHEL, 2001; SCHLESINGER u. JOFFE, 2011), sondern auch für Menschen (LENZ et al., 2009; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2017) eine Infektionsquelle darstellen. Neben bakteriellen Pathogenen sind als weitere biologische Gefahren

Parasiten und Viren zu berücksichtigen (HINNEY, 2018; DAVIES et al., 2019).

Für rohes Heimtierfutter gibt es im EU-Recht zwar keine mikrobiologischen Anforderungen zum Zeitpunkt der Verwendung, aber es sind während Herstellung und Lagerung im Lebensmittelunternehmen die folgenden Anforderungen für eine Produktcharge einzuhalten: in 5 Teilproben zu je 25 g darf *Salmonella* nicht nachweisbar sein; die Enterobacteriaceengehalte dürfen in keiner der fünf Proben 5000 KbE/g überschreiten und müssen in mindestens 3/5 Proben ≤ 10 KbE/g betragen (VERORDNUNG (EG) Nr. 142/2011). In Schweden gelten für nicht-fermentiertes, nicht getrocknetes rohes Tierfutter folgende Richtwerte (HELLGREN et al., 2019): aerobe mesophile Keimzahl ≤ 5000000 KbE/g; Coliforme ≤ 50000 KbE/g; anaerobe Bakterien ≤ 5000 KbE/g; *Salmonella* nicht nachweisbar in 25 g. VAN BREE et al. (2018) verwendeten lebensmittelbezogene Grenzwerte, nämlich die oberen Grenzwerte („M“) für Hackfleisch der VO (EG) Nr. 2073/2005.

In dieser Studie wurde die mikrobiologische Qualität von in Wien angebotenen tiefgekühlten Futtermitteln aus Rindermuskelfleisch zur Rohfleischfütterung für Hunde untersucht. Da sich bei der Durchsicht der Produktpalette der Verkaufsstätten (s.u.) ergab, dass die breiteste Produktpalette für Erzeugnisse aus Rindergewebe bestand, beschränkte sich die Probenahme auf Erzeugnisse aus Rindermuskelfleisch.

Material und Methoden

Über eine online-Suchmaschine wurde nach Treffern für „BARF Wien“ gesucht und alle so auffindbaren Geschäfte gelistet. Anschließend wurde, wenn vorhanden, die Website der Verkaufsstätte nach Produktauflistungen durchsucht. Alle Läden, welche Produkte aus Rindermuskelfleisch vertrieben, die ohne Vorbestellung direkt vor Ort erworben werden konnten, wurden berücksichtigt (n = 20). Anschließend wurden innerhalb von zwei Monaten im Herbst 2018 diese Geschäfte besucht und die zu diesem Zeitpunkt erhältlichen Produkte aus Rindermuskelfleisch, insgesamt 96 Stück, erworben. Produkte, welche laut Etikett auch andere Gewebearten oder Nicht-Fleisch-Komponenten enthielten, sowie solche, die nur auf Vorbestellung erhältlich waren, wurden ausgeschlossen. Die Produkte waren zum Zeitpunkt des Kaufes tiefgekühlt und wurden gekühlt auf schnellstem Weg zum Untersuchungsort gebracht, wo sie bei -20 °C zwischengelagert wurden. Für die Untersuchung wurden die tiefgekühlten Produkte bei $+2$ °C über Nacht aufgetaut.

Mikrobiologische Untersuchung

Die Verpackung der angetauten Produkte wurde nach Abreiben mit 70 %igem Ethanol mit einem sterilen Messer eröffnet, anschließend erfolgte mit einer sterilen Pinzette an 6 verschiedenen Stellen die Probenahme für die mikrobiologische Untersuchung. Für die Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl und der Enterobacteriaceen wurden von jedem Produkt 20 g in einen sterilen Kunststoffbeutel eingewogen und neun Gewichtsteile Pepton-Kochsalz-Lösung hinzugegeben, so dass eine Verdünnung von 1:10 entstand.

Für die Beprobung auf Salmonellen, Listerien und thermophile *Campylobacter* wurden auf die gleiche Weise je 25 g Probe entnommen und mit der neunfachen Menge gepuffertem Peptonwasser bzw. Halb-Fraser- bzw. Bolton-Bouillon im sterilen Plastiksack aufgefüllt. Anschließend wurden die befüllten Plastiksäcke in den Stomacher zur Homogenisierung eingebracht und 3 Minuten lang geknetet.

Die Anreicherungssuspensionen für Salmonellen wurden nun für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend 0,4 ml der Anreicherungskultur in drei Tropfen auf MSR/V-Agar aufgetragen. Der Agar wurde 24 Stunden bei 42 °C bebrütet und sofern um die Inokulationsstelle Schwärmzonen auftraten, wurden diese auf XLD-Agar mittels Ösenausstrich übertragen. Der XLD-Agar wurde 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Transparente Kolonien mit schwarzem Zentrum ohne Gelbfärbung des darunterliegenden Nährbodens wurden auf PCA-Agar überimpft und nach Bebrütung (24 Stunden bei 37 °C) wurde mit omnivalentem Anti-*Salmonella*-Serum und ggf. mit Faktorseren für die Gruppen B, C, D und E auf Agglutination geprüft. Parallel erfolgte die biochemische Identifizierung (Enteropluri®). Die als präsumtive Salmonellen eingestuften Isolate wurden zur Bestätigung an das nationale Referenzlabor (Linz, Österreich) übersendet und dort serotypisiert (White-Kauffmann-Le Minor Schema).

Die Anreicherungssuspensionen für Listerien wurden bis zu 48 Stunden bei 30 °C inkubiert. Kulturen mit Braunfärbung nach 24 oder 48 Stunden wurden mittels Ösenausstrich auf OCLA-Agar übertragen, der 48 Stunden bei 37 °C bebrütet wurde. Blaue bis türkisarabene Kolonien mit Trübungshof wurden als verdächtig für *Listeria monocytogenes* angesehen. Eine weitere Abklärung erfolgte über immunologische Verfahren (Vidas® LDuo).

Die Anreicherungssuspensionen für *Campylobacter* wurden unter mikroaerophilen Bedingungen (CO_2 Schrank mit 5 % CO_2) bei 42 °C für 48 Stunden bebrütet. 5 ml der Anreicherungskultur wurden für 5 min auf 100 °C erhitzt und die Suspension nach Abkühlen auf *Campylobacter*-Antigen untersucht (Vidas® CAM).

Aus der Erstverdünnung für die Keimzahlbestimmungen wurde eine dezimale Verdünnungsreihe mit Pepton-Kochsalz-Lösung hergestellt und die nachfolgenden Agarmedien im Spatelverfahren (0,1 ml) beimpft: Plate-Count-Agar (PCA) für die aerobe mesophile Keimzahl, bebrütet bei 30 °C für 48–72 Stunden; Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar nach Kielwein für Pseudomonaden, bebrütet bei Raumtemperatur (20–25 °C) für 72 Stunden; MRS-Agar für Milchsäurebakterien, bebrütet bei 30 °C für 48 Stunden; Violet Red Bile Dextrose-Agar für Enterobacteriaceen, bebrütet bei 37 °C für 24 Stunden; Baird-Parker-Agar für Staphylokokken, bebrütet bei 37 °C für 48 Stunden. Zur Bestimmung von *E. coli* wurde Coli ID-F-Agar im Gussplattenverfahren (1,0 ml Probenverdünnung) beimpft und die Agarplatten wurden bei 42 °C für 24 Stunden inkubiert. Die Agar-Platten für die aerobe mesophile Keimzahl, Pseudomonaden, Milchsäurebakterien, Enterobacteriaceen, Staphylokokken und *E. coli* wurden nach der jeweiligen Bebrütungsphase ausgezählt; dabei wurden alle Agarplatten mit bis zu 300 Kolonien berücksichtigt.

pH- und Wasseraktivitäts (a_w)-Wert-Messung

Der pH-Wert wurde mittels Einstichelektrode mit Temperaturkompensation an drei Stellen im Produkt gemessen und der Mittelwert angegeben. Etwa 10 g Probe wurden vorzerkleinert, gemischt und mit dem Material wurden zwei Messungen der Wasseraktivität (Taupunktbestimmung) vorgenommen.

Datenauswertung/Statistik

Die Ergebnisse der quantitativen mikrobiologischen Untersuchung wurden in \log_{10} -Werte transformiert. Für Ergebnisse unter der Nachweisgrenze (*E. coli*: 10 KbE/g, sonst 100 KbE/g) wurde der Wert für die halbe Nachweisgrenze eingesetzt. Die \log_{10} transformierten

Ergebnisse wurden auf Normalverteilung geprüft (Kolmogorov-Smirnov Test) und die (Pearson-) Korrelationen der aeroben mesophilen Keimzahlen mit den Konzentrationen von Pseudomonaden, Milchsäurebakterien, Staphylokokken, Enterobacteriaceen und *E. coli* berechnet (Statgraphics 3.0, Statistical Graphics Corp., Princeton, N.J.). Für die Beurteilung der statistischen Signifikanz der Korrelationskoeffizienten wurde $p < 0,05$ gewählt.

Bezugsquellennachweis

Anti-Salmonella Sera, Sifin, Berlin, D; aW-Meter Swiftlab aW, Novasina, Lachen, CH; Baird-Parker-Agar, Merck 105406, Merck, Darmstadt, D; Bolton-Bouillon, Oxoid CM0983, Oxoid, Basingstoke, UK; CO² Schrank Revco, ThermoFisher, Waltham, MA, USA; Coli ID-F-Agar, BioMerieux, Marcy l’Etoile, F; EnteroPluri®, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, I; gepuffertes Peptonwasser, Oxoid BM1104; Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar nach Kielwein, Merck 110230; Halb-Fraser-Bouillon, Merck 100025; MRS-Agar nach deMan, Rogosa und Sharpe, Merck 110660; MSRV-Agar, Oxoid CM1112; OCLA-Agar; Oxoid CM1084 mit Supplement SR0244; Pepton-Kochsalz-Lösung, Oxoid CM0733; pH-Meter Testo 205, Testo AG, Lenzkirch, D; Plate-Count-Agar, Merck 105463; Stomacher 400, Interscience, St. Nom, F; Vidas® CAM, Vidas® LDuo, BioMerieux; Violet Red Bile Dextrose-Agar für Enterobacteriaceen, Merck 110275; XLD-Agar, Merck 105287.

Ergebnisse

Mikrobiologisches Profil, pH-Wert, Wasseraktivität (a_w)

Der durchschnittliche pH-Wert aller Proben betrug $6,24 \pm 0,29$, bei den Erzeugnissen „Kehl- und Halsfleisch“ war der Wert etwas höher (Tab. 1). Der durchschnittliche a_w-Wert betrug $0,966 \pm 0,006$. Die aerobe mesophile Keimzahl aller Proben betrug im Mittel $7,6 \pm 1,1 \log_{10}$ KbE/g (Spannweite $4,8-9,4 \log_{10}$ KbE/g). *Pseudomonas* spp. kamen in allen Proben im Mittel mit $7,0 \pm 1,5 \log_{10}$ KbE/g vor, wobei die Erzeugnisgruppe „Kopffleisch“ mit $7,4 \pm 1,5 \log_{10}$ KbE/g die höchsten, die Gruppe „sonstige Muskulatur“ mit $6,6 \pm 1,5 \log_{10}$ KbE/g die niedrigsten Werte

aufwies. Die anderen Keimgruppen hatten einen geringeren Anteil (< 10 %) an der aeroben mesophilen Keimzahl: Die Mittelwerte für Milchsäurebakterien, Staphylokokken, Enterobacteriaceen und *E. coli* betragen $5,7 \pm 1,0 \log_{10}$ KbE/g; $4,0 \pm 0,8 \log_{10}$ KbE/g; $4,9 \pm 1,1 \log_{10}$ KbE/g bzw. $3,0 \pm 1,3 \log_{10}$ KbE/g. Bei der Darstellung nach Hersteller ergaben sich größere Unterschiede der Mittelwerte (Abb. 1), die Probenzahl je Hersteller war aber sehr verschieden (1–33; Tab. 2). Die Korrelation der aeroben mesophilen Keimzahlen mit den Konzentrationen von Pseudomonaden betrug $r = 0,92$ ($p = 0,004$). Niedrigere Werte wurden für den Vergleich der aeroben mesophilen Keimzahlen mit Milchsäurebakterien ($r = 0,65$; $p < 0,001$), Staphylokokken ($r = 0,57$; $p < 0,001$),

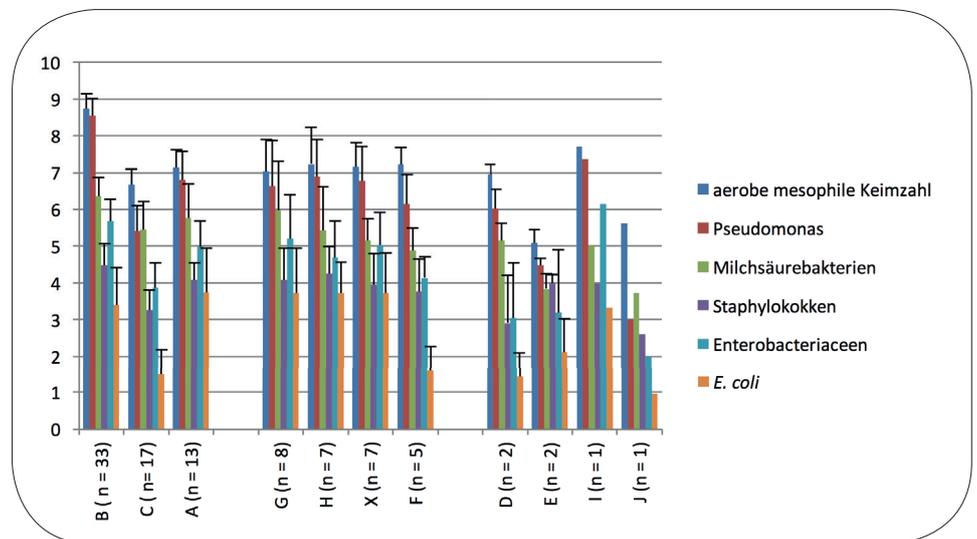


Abb. 1: Allgemeiner mikrobiologischer Status von Rindfleisch zur Rohfütterung an Hunde, nach Anzahl der Produkte je Hersteller geordnet (A–J, Erzeugnisse ohne Herstellerangabe unter „X“ zusammengefasst), Werte in log₁₀ KbE/g / General microbiological status of beef for raw feeding of dogs, according to number of products per manufacturer (A–J; X = products without labelling), data in log cfu/g

Tab. 1: Untersuchungsergebnisse für pH-Wert, Wasseraktivität und allgemeine Mikrobiologie (log₁₀ KbE/g) nach Probenart (Mittelwert ± Standardabweichung) / pH, water activity and general microbiological status (log cfu/g) according to sample type (mean ± standard deviation)

	Kopffleisch (n = 41)	Kehl- und Halsfleisch (n = 19)	Sonstiges Fleisch (n = 36)
pH	6,26 ± 0,21	6,47 ± 0,21	6,09 ± 0,31
Wasseraktivität	0,965 ± 0,006	0,967 ± 0,006	0,966 ± 0,006
Aerobe mesophile Keimzahl	7,79 ± 1,13	7,54 ± 0,79	7,29 ± 1,09
Pseudomonaden	7,35 ± 1,49	7,11 ± 1,12	6,59 ± 1,54
Milchsäurebakterien	5,59 ± 0,98	5,87 ± 1,03	5,83 ± 0,88
Koagulasenegative Staphylokokken	4,12 ± 0,70	4,26 ± 0,71	3,76 ± 0,86
Enterobacteriaceen	5,11 ± 1,02	4,94 ± 0,97	4,60 ± 1,22
<i>E. coli</i>	3,13 ± 1,00	3,16 ± 1,40	2,77 ± 1,57

Tab. 2: Aufgliederung nach Probenart, Hersteller und nach Anzahl der Proben mit Nachweisen von *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. und hohen aeroben mesophilen Keimzahlen und Enterobacteriaceengehalten / Numbers of samples according to sample type and producer and to the presence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. or high numbers of aerobic mesophilic bacteria and Enterobacteriaceae

Hersteller	Kopffleisch					Kehl- und Halsfleisch					Sonstige Muskulatur					Alle Proben				
	gesamt	AMK > 8 log ₁₀ KBE/g	<i>L. monocytogenes</i> nachweisbar	<i>Salmonella</i> nachweisbar	Enterobacteriaceen > 5000 KBE/g	gesamt	AMK > 8 log ₁₀ KBE/g	<i>L. monocytogenes</i> nachweisbar	<i>Salmonella</i> nachweisbar	Enterobacteriaceen > 5000 KBE/g	gesamt	AMK > 8 log ₁₀ KBE/g	<i>L. monocytogenes</i> nachweisbar	<i>Salmonella</i> nachweisbar	Enterobacteriaceen > 5000 KBE/g	gesamt	AMK > 8 log ₁₀ KBE/g	<i>L. monocytogenes</i> nachweisbar	<i>Salmonella</i> nachweisbar	Enterobacteriaceen > 5000 KBE/g
A	3	1	0	1	3	5	1	0	1	4	5	0	1	0	5	13	2	1	2	12
B	18	17	1	2	18	5	4	0	0	5	10	10	2	0	10	33	31	3	2	33
C	3	0	1	0	3	4	0	1	1	2	10	0	0	0	5	17	0	2	1	10
D											2	0	0	0	2	2	0	0	0	2
E											2	0	0	0	1	2	0	0	0	1
F	3	0	0	0	2						2	0	0	0	2	5	0	0	0	4
G	2	0	0	0	0	4	0	0	0	4	2	0	0	0	2	8	0	0	0	6
H	3	1	0	2	3	1	0	0	0	1	3	0	0	0	2	7	1	0	2	6
I	1	0	0	0	1										1	0	0	0	1	
J	1	0	0	0	0										1	0	0	0	0	
X	7	0	4	0	7										7	0	4	0	7	
Total	41	19	6	5	37	19	5	1	2	16	36	10	3	0	29	96	34	10	7	82

AMK = aerobe mesophile Keimzahl; Anzahl der Proben mit Pathogennachweisen oder erhöhten Werten grau unterlegt; X = Erzeugnisse ohne Herstellerangabe / AMK = aerobic mesophilic bacteria; numbers in grey-shaded cells indicate samples in which pathogens were detected or that had high bacterial counts; X = Products without labelling

Enterobacteriaceen ($r = 0,74$; $p < 0,001$) und *E. coli* ($r = 0,39$; $p < 0,001$) erhalten.

Von einer Prüfung, ob der Faktor „Hersteller“ einen statistisch signifikanten Einfluss auf die mikrobiologische Beschaffenheit der Proben hatte, wurde abgesehen, da die Probenzahl je Hersteller stark unterschiedlich war und innerhalb dieser Gruppen die Aufteilung auf die drei Produktkategorien sehr unregelmäßig war und sich daher viele schwach besetzte Zellen ergaben (Tab. 2).

Pathogene Bakterien

Listeria monocytogenes wurde in 10,4 % der Proben (10/96) nachgewiesen. Fünf der zehn positiven Produkte befanden sich in der Gruppe „Kopffleisch“, eine positive Probe stammte aus der Gruppe „Kehl- und Halsfleisch“, die restlichen gehörten zur Gruppe „sonstige Muskulatur“.

Salmonella spp. wurden in 7/96 Proben nachgewiesen (7,3 %), es handelte sich um *S. Typhimurium* (drei

Isolate), je ein Isolat von *S. London*, *S. Senftenberg*, *S. Coeln* und ein monophasisches Isolat war der Gruppe E1 zuzuordnen. Fünf Isolate stammten von „Kopffleisch“ (5/41), zwei von „Kehl- und Halsfleisch“ (2/19), in der Gruppe „sonstige Muskulatur“ wurden keine Salmonellen nachgewiesen (0/36).

Campylobacter spp. war über das Antigennachweissystem in keiner der 96 Proben nachweisbar.

Diskussion

pH-Wert, Wasseraktivität und allgemeines mikrobiologisches Profil

Der pH-Wert aller Proben betrug im Durchschnitt $6,24 \pm 0,29$, was höher ist als bei Muskelfleisch vom Rind erwartet wird (5,4–5,8; LAWRIE u. LEDWARD, 2006). Bei 90/96 Proben (93,8 %) war der pH-Wert über 5,8 und damit für Fleisch hoch, was das Bakterienwachstum und damit den Verderb begünstigt

bzw. kann der hohe pH-Wert ein Indiz für bereits vorliegende Fäulnis sein (WEBER, 2008). Der a_w -Wert aller Proben betrug im Durchschnitt $0,966 \pm 0,006$, was im Optimalbereich für die meisten Bakterien liegt (0,9–1,0; WEBER, 2010). Es handelt sich somit um verderbsanfällige Erzeugnisse, die zweckmäßigerweise tiefgekühlt in Verkehr gebracht wurden.

Mit geruchlichen Abweichungen ist je nach dominierender Bakterienart bei aeroben mesophilen Keimzahlen von ca. 10^7 – 10^8 KbE/g oder - bezogen auf Lebensmitteloberflächen - cm^2 zu rechnen, insbesondere wenn ein wesentlicher Anteil der Mikroflora proteolytisch aktiv ist (Pseudomonaden) (UPMANN et al., 2000). Nur 30,2 % der Proben wiesen aerobe mesophile Keimzahlen unter 10^7 KbE/g auf, bei 35,4 % (34/96) waren es mehr als 10^8 KbE/g (Tab. 2). Die damit verbundenen farblichen und geruchlichen Veränderungen würden bei dem Lebensmittel „frisches Fleisch“ zu einer Beurteilung als verdorben führen (WEBER, 2008). Sowohl innerhalb der Produktgruppen als auch bei den Produkten eines Herstellers ergaben sich deutliche Schwankungen der Keimgehalte. Ähnliches wurde auch von VAN BREE et al. (2018) und HELLGREN et al. (2019) beschrieben und kann als Hinweis auf eine ungenügende Standardisierung des Rohmaterials angesehen werden.

Pathogene Bakterien

Die Häufigkeit von Salmonellennachweisen entspricht mit 7,3 % praktisch der von HELLGREN et al. (2019) berichteten Nachweishäufigkeit in BARF-Proben aus Schweden (7 % bzw. 4/60), ist aber niedriger als die von CHENGAPPA et al. (1993) (45 %), WEESE et al. (2005) (20 %) und VAN BREE et al. (2018) (20 %) berichteten Prävalenzen. Bemerkenswerter Weise enthielten 3 der 4 Salmonellen-positiven Proben aus Schweden Rindergewebe als alleinige Komponente tierischer Herkunft. Eine Exposition des Menschen ist nicht auszuschließen, entweder durch unsachgemäßen Umgang mit dem Futtermittel, dem Geschirr oder ggf. über die Ausscheidungen von mit Salmonellen infizierten Hunden (PITOUT et al., 2003; WEESE u. ROUSSEAU, 2006; LAMBERTINI et al., 2016).

Campylobacter spp. wurden in keiner Probe nachgewiesen, was auch durch die Tiefkühlagerung der Futtermittel bedingt sein könnte (ICMSF, 1996; GRUNTAR et al., 2015), obwohl auch aus tiefgekühltem BARF-Futter *Campylobacter* isoliert werden konnten (HELLGREN et al., 2019). In nicht-tiefgekühltem BARF-Futter wurden Nachweisraten von bis zu 76 % berichtet (BOJANIC et al., 2017). Rohfütterung könnte zum Teil die Ursache für das von PÖZLER et al. (2018) beschriebene Vorkommen von *C. jejuni* und *C. upsaliensis* in der österreichischen Hunde- und Katzenpopulation sein. *Listeria monocytogenes* wurde in 10,4 % der Proben nachgewiesen. Das entspricht fast dem Doppelten der von NEMSER et

al. (2014) berichteten Häufigkeit (5,6%), liegt jedoch deutlich unter der Prävalenz von 54 % einer Studie aus den Niederlanden (VAN BREE et al., 2018). Die Unterschiede sind plausibel, da die in den verschiedenen Studien untersuchten Futtermittel verschiedene tierische Gewebe und z.T. pflanzliches Material enthielten bzw. aus verschiedenen Erzeugerländern stammten.

Bewertung nach EU-Kriterien bzw. Richtwerten

Die VERORDNUNG (EG) Nr. 142/2011 sieht für rohes Heimtierfutter mikrobiologische Kriterien für Enterobacteriaceen und *Salmonella* vor. Diese gelten zwar bei der Herstellung und Lagerung vor dem Versand, da die Produkte aber tiefgekühlt angeboten wurden, erscheint es gerechtfertigt, diese Norm für eine Beurteilung der Proben zu verwenden. Da jeweils nur eine und nicht 5 Teilproben einer Charge untersucht wurden, kann nur mit dem oberen Grenzwert („M“) verglichen werden. Demnach erfüllten 7/96 Proben (7,3 %) das *Salmonella*-Kriterium (nicht nachweisbar in 5 Proben zu je 25 g) nicht, und 82/96 (85,4 %) erfüllten das Enterobacteriaceen-Kriterium ($M \leq 5000$ KbE/g) nicht. Es gab aber deutliche Unterschiede zwischen den Herstellern (Tab. 2).

Bei der Anwendung der Grenzwerte für Hackfleisch (VO (EG) Nr. 2073/2005) überschritten 76/96 Proben (79,2 %) den Grenzwert von 5 Millionen KbE/g für die aerobe mesophile Keimzahl und 54/96 Proben (56,3 %) jenen für *E. coli* (500 KbE/g). Ein ähnlich hoher Prozentsatz von mit *E. coli* belasteten Proben wurde auch von VAN BREE et al. (2018) berichtet (40 % bzw. 14/35), die aerobe mesophile Keimzahl war aber in dieser Untersuchung immer unter 5 Millionen KbE/g.

Der in Schweden (HELLGREN et al., 2019) geltende Richtwert für die aerobe mesophile Keimzahl in rohem Heimtierfutter entspricht dem „M“ Wert der VO (EG) Nr. 2073/2005. Bei der Anwendung des schwedischen Richtwerts für Coliforme (≤ 50000 KbE/g) ist zu beachten, dass Coliforme nur eine Subpopulation der Enterobacteriaceen darstellen, d.h. dass bei Enterobacteriaceengehalten > 50000 KbE/g nicht automatisch davon ausgegangen werden kann, dass auch die Coliformenzahlen über dem Richtwert liegen. Unter der Annahme, dass die Enterobacteriaceen in BARF-Futter großteils zu den Coliformen gehören (HELLGREN et al., 2019), wären 60,4 % der Proben aus dem Raum Wien über dem schwedischen Richtwert.

Hohe Enterobacteriaceengehalte müssen auch unter dem Aspekt der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen gesehen werden, da diese Bakteriengruppe oft Resistenzgene aufweist (DAVIES et al., 2019).

Einschränkungen der Studie

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass zwar versucht wurde, das gesamte am Markt

erhältliche Sortiment aus rohem Rindfleisch zu erfassen, dass aber keine Wiederholungsbeprobungen vorgenommen wurden und auch die tatsächlich verkauften Mengen (neben dem Handling des Futters durch die Tierhalterinnen und Tierhalter) bei einer Expositionsabschätzung zu berücksichtigen wären. Die Ursachen für die insgesamt unbefriedigende mikrobiologische Qualität können im Bereich der Rohstoffbereitstellung am Schlachthof, beim Transport oder bei der Bearbeitung und Lagerung beim Tierfutterhersteller liegen und sowohl Kontaminationsereignisse als auch Lagerungsbedingungen (Zeit-Temperaturprofile und Luftfeuchtigkeit, ggf. Einfrier- und

Auftauvorgänge bei der Chargierung) umfassen. Zur Ursachenabklärung wäre letztlich eine betriebsübergreifende Erfassung der Warenkette „BARF“-Tierfutter mit mikrobiologischen Stufenkontrollen nötig.

Danksagung

Der Nationalen Referenzzentrale für Salmonellen in der AGES in Graz sei für die Typisierung der *Salmonella* Isolate gedankt.

Fazit für die Praxis:

Rindfleischprodukte zur Rohverfütterung an Hunde können pathogene Bakterien beherbergen, was ein Risiko der Infektion des Tieres und in weiterer Folge der Tierhalterinnen bzw. Tierhalter mit sich bringt. Die untersuchten tiefgekühlten Produkte wiesen hohe Keimzahlen auf, insbesondere von Proteolyten (*Pseudomonas*), sodass das Futtermittel nach dem Auftauen auch sofort verbraucht werden sollte. Beim Auftauen ist eine Kontamination von Lebensmitteln unbedingt zu vermeiden. Der Händehygiene und der Reinigung der Futterschüsseln ist besonderes Augenmerk zu schenken.

Literatur

- ADAK, G.K., COWDEN, J.M., NICHOLAS, S., EVANS, S. (1995): The Public Health Laboratory Service national case-control study of primary indigenous sporadic cases of *Campylobacter* infection. *Epidemiol Infect* **115**, 15–22.
- BOJANIC, K., MIDWINTER, A.C., MARSHALL, J.C., ROGERS, L.E., BIGGS, P.J., ACKE, E. (2017): Isolation of *Campylobacter* spp. from Client-Owned Dogs and Cats, and Retail Raw Meat Pet Food in the Manawatu, New Zealand. *Zoonoses Public Health* **64**, 438–449.
- BUETTNER, S., WIELAND, B., STAERK, K.D., REGULA, G. (2010): Risk attribution of *Campylobacter* infection by age group using exposure modelling. *Epidemiol Infect* **138**, 1748–1761.
- CARRIQUE-MAS, J., ANDERSSON, Y., HJERTQVIST, M., SVENSSON, A., TORNER, A., GIESECKE, J. (2005): Risk factors for domestic sporadic campylobacteriosis among young children in Sweden. *Scand J Infect Dis* **37**, 101–110.
- CHENGAPPA, M.M., STAATS, J., OBERST, R.D., GABBERT, N.H., MCVEY, S. (1993): Prevalence of *Salmonella* in raw meat used in diets of racing greyhounds. *J Vet Diagn Invest* **5**, 372–377.
- DAVIES, R.H., LAWES, J.R., WALES, A.D. (2019): Raw diets for dogs and cats: a review, with particular reference to microbiological hazards. *J Small Anim Pract* **60**, 329–339.
- FCI - FEDERATION CYNOLOGIQUE INTERNATIONALE (2019): <http://www.fci.be/de/statistics/ByNco.aspx?iso=AT>; letzter Zugriff: 05.02.2019.
- FINLEY, R., REID-SMITH, R., RIBBLE, C., POPA, M., VANDERMEER, M., ARAMINI, J. (2008): The Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonellae* isolated from Commercially Available Canine Raw Food Diets in Three Canadian Cities. *Zoonoses Public Health* **55**, 462–469.
- FINLEY, R., RIBBLE, C., ARAMINI, J., VANDERMEER, M., POPA, M., LITMAN, M., REID-SMITH, R. (2007): The risk of *Salmonellae* shedding by dogs fed *Salmonella*-contaminated commercial raw food diets. *Can Vet J* **48**, 69–75.
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., HEIKKILÄ, T., PERNU, N., KOVANEN, S., HJELM-BJÖRKMAN, A., KIVISTÖ, R. (2017): Raw Meat-Based Diets in Dogs and Cats. *Vet Sci* **4**, 33. doi:10.3390/vetsci4030033
- FREEMAN, L.M., MICHEL, K.E. (2001): Evaluation of raw food diets for dogs. *J Am Vet Med Assoc* **218**, 705–709.
- GIACOMELLI, M., FOLLADOR, N., COPPOLA, L.M., MARTINI, M., PICCIRILLO, A. (2015): Survey of *Campylobacter* spp. in owned and unowned dogs and cats in Northern Italy. *Vet J* **204**, 333–337.
- GIACOMETTI, F., MAGAROTTO, J., SERRAINO, A., PIVA, S. (2017): Highly suspected cases of salmonellosis in two cats fed with a commercial raw meat-based diet: health risk to animals and zoonotic implications. *BMC Vet Res* **13**, 224. doi:10.1186/s12917-017-1143-z
- GRUNTAR, I., BIASIZZO, M., KUŠAR, D., PATE, M., OCEPEK, M. (2015): *Campylobacter jejuni* contamination of broiler carcasses: Population dynamics and genetic profiles at slaughterhouse level. *Food Microbiol* **50**, 97–101.
- HELLGREN, J., STAAF HÄSTÖ, L., WIKSTRÖM, C., FERNSTRÖM, L.-L., HANSSON, I. (2019): Occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium* and Enterobacteriaceae in raw meat-based diets for dogs. *Vet Rec* **184**, 442. doi:10.1136/vr.105199
- HINNEY, B. (2018): The trend of raw meat-based diets: risks to people and animals. *Vet Rec* **182**, 47–49.
- HOLMBERG, M., ROSENDAL, T., ENGVALL, E.O., OHLSON, A., LINDBERG, A. (2015): Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in Swedish dogs and characterization of *C. jejuni* isolates. *Acta Vet Scand* **57**, 19. doi: 10.1186/s13028-015-0108-0

- ICMSF (1996): *Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens*. Blackie Academic & Professional, London.
- JOFFE, D.J., SCHLESINGER, D.P. (2002): Preliminary assessment of the risk of *Salmonella* infection in dogs fed raw chicken diets. *Can Vet J* **43**, 441–442.
- LAMBERTINI, E., BUCHANAN, R.L., NARROD, C., PRADHAN, A.K. (2016): Transmission of Bacterial Zoonotic Pathogens between Pets and Humans: The Role of Pet Food. *Crit Rev Food Sci Nutr* **56**, 364–418.
- LAWRIE, R.L., LEDWARD, D. (2006): *Lawrie's Meat Science*. 7th ed., Woodhead Publ, Cambridge, UK.
- LEFEBVRE, S.L., REID-SMITH, R., BOERLIN, P., WEESE, J.S. (2008): Evaluation of the Risks of Shedding *Salmonellae* and Other Potential Pathogens by Therapy Dogs Fed Raw Diets in Ontario and Alberta. *Zoonoses Public Health* **55**, 470–480.
- LENZ, J., JOFFE, D., KAUFFMAN, M., ZHANG, Y., LEJEUNE, J. (2009): Perceptions, practices and consequences associated with pathogens and the feeding of raw meat to dogs. *Can Vet J* **50**, 637–643.
- MAGISTRAT DER STADT WIEN (2019): <https://www.wien.gv.at/statistik/lebensraum/tabellen/hundebestand-bez.html>; letzter Zugriff: 05.02.2019.
- MICHEL, K.E. (2006): Unconventional diets for dogs and cats. *Vet Clin Small Anim Pract* **36**, 1269–1281.
- MORGAN, S.K., WILLIS, S., SHEPHERD, M.L. (2017): Survey of owner motivations and veterinary input of owner feeding diets containing raw animal products. *Peer J* **5**, e3031. doi:10.7717/peerj.3031
- NEIMANN, J., ENGBERG, J., MØLBAK, K., WEGENER, H.C. (2003): A case-control study of risk factors for sporadic *Campylobacter* infections in Denmark. *Epidemiol Infect* **130**, 353–366.
- NEMSER, S.M., DORAN, T., GRABENSTEIN, M., MCCONNELL, T., MCGRATH, T., PAMBOUKIAN, R., SMITH, A.C., ACHEN, M., DANZEISEN, G., KIM, S., LIU, Y., ROBESON, S., ROSARIO, G., MCWILLIAMS WILSON, K., REIMSCHUESSEL, R. (2014): Investigation of *Listeria*, *Salmonella*, and toxigenic *Escherichia coli* in various pet foods. *Foodborne Pathog Dis* **11**, 706–709.
- PITOUT, J.D.D., REISBIG, M.D., MULVEY, M., CHUI, L., LOUIE, M., CROWE, L., CHURCH, D.L., ELSAYED, S., GREGSON, D., AHMED, R., TILLEY, P., HANSON, N.D. (2003): Association between Handling of Pet Treats and Infection with *Salmonella enterica* Serotype Newport Expressing the AmpC β -Lactamase, CMY-2. *J Clin Microbiol* **41**, 4578–4582.
- PÖLZLER, T., STÜGER, H.P., LASSNIG, H. (2018): Prevalence of most common human pathogenic *Campylobacter* spp. in dogs and cats in Styria, Austria. *Vet Med Sci* **4**, 115–125.
- SCHLESINGER, D.P., JOFFE, D.J. (2011): Raw food diets in companion animals: A critical review. *Can Vet J* **52**, 50–54.
- STAFFORD, R.J., SCHLUTER, P.J., WILSON, A.J., KIRK, M.D., HALL, G., UNICOMB, L., OZFOODNET WORKING GROUP (2008): Population-attributable risk estimates for risk factors associated with *Campylobacter* infection, Australia. *Emerg Infect Dis* **14**, 895–901.
- STIVER, S.L., FRAZIER, K.S., MAUEL, M.J., STYER, E.L. (2003): Septicemic Salmonellosis in Two Cats Fed a Raw-Meat Diet. *J Am Anim Hosp Assoc* **39**, 538–542.
- STONE, G.G., CHENGAPPA, M.M., OBERST, R.D., GABBERT, N.H., MCVEY, S., HENNESSY, K.J., MUENZENBERGER, M., STAATS, J. (1993): Application of polymerase chain reaction for the correlation of *Salmonella* serovars recovered from greyhound feces with their diet. *J Vet Diagn Invest* **5**, 378–385.
- STROHMEYER, R.A., MORLEY, P.S., HYATT, D.R., DARGATZ, D.A., SCORZA, A.V., LAPPIN, M.R. (2006): Evaluation of bacterial and protozoal contamination of commercially available raw meat diets for dogs. *J Am Vet Med Assoc* **228**, 537–542.
- UPMANN, M., PAULSEN, P., JAMES, C., SMULDERS, F.J.M. (2000): Die Mikrobiologie von Kälte behandeltem Fleisch. *Fleischwirtsch* **80**, 90–97.
- VAN BREE, F.P.J., BOKKEN, G.C.A.M., MINEUR, R., FRANSSEN, F., OPSTEEGH, M., VAN DER GIESSEN, J.W.B., LIPMAN, L.J.A., OVERGAAUW, P.A.M. (2018): Zoonotic bacteria and parasites found in raw meat-based diets for cats and dogs. *Vet Rec* **182**, 50. doi:10.1136/vr.104535535
- WEBER, H. (2008): *Mikrobiologie der Lebensmittel: Band 3: Fleisch - Fisch - Feinkost*. 2. Aufl., Behr's, Hamburg, 25–27.
- WEBER, H. (2010): *Mikrobiologie der Lebensmittel: Band 1: Grundlagen*. 9. Aufl., Behr's, Hamburg, 136–137.
- WEESE, J.S., ROUSSEAU, J., ARROYO, L. (2005): Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. *Can Vet J* **46**, 513–516.
- WEESE, J.S., ROUSSEAU, J. (2006): Survival of *Salmonella* Copenhagen in food bowls following contamination with experimentally inoculated raw meat: Effects of time, cleaning, and disinfection. *Can Vet J* **47**, 887–889.
- WIELAND, B., REGULA, G., DANUSER, J., WITTEW, M., BURNENS, A.P. (2005): *Campylobacter* spp. in dogs and cats in Switzerland: risk factor analysis and molecular characterization with AFLP. *J Vet Med B* **52**, 183–189.
- ZIMMERMANN, S. (2013): Umfrage zum Thema Rohfütterung „BARF“ unter Hundebesitzern in Österreich und Deutschland und rechnerische Überprüfung von BARF-Rationen. Diplomarbeit, Veterinärmedizinische Universität Wien.

Rechtsnormen

- VO (EG) Nr. 2073/2005 DER KOMMISSION vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. ABl. L338, 1–26.
- VO (EG) Nr. 142/2011 DER KOMMISSION vom 25. Februar 2011 zur Durchführung der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates mit Hygienevorschriften für nicht für den menschlichen Verzehr bestimmte tierische Nebenprodukte sowie zur Durchführung der Richtlinie 97/78/EG des Rates hinsichtlich bestimmter gemäß der genannten Richtlinie von Veterinärkontrollen an der Grenze befreiter Proben und Waren. ABl. L54, 1–254.