

VESTNÍK

Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky

Ročník XXXV

13. november 2003

Čiastka 23

O b s a h:

74. Štatút zo 6. novembra 2003 č. 3477/2003-100, ktorým sa dopĺňa Štatút rezortnej komisie Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky pre poskytovanie podpôr v pôdohospodárstve č. 535/03 - 100 z 25.2.2003
75. Štatút zo 6. novembra 2003 č. 3478/2003-100, ktorým sa dopĺňa Štatút regionálnej komisie Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky pre poskytovanie podpôr v pôdohospodárstve č. 536/03 - 100 z 25. 2. 2003
76. Doplnok č. 2 k Metodickému usmerneniu k niektorým ustanoveniam výnosu Ministerstva pôdohospodárstva SR z 21. januára 2003 č.148/2/2003-100, o podpore podnikania v poľnohospodárstve, v znení výnosu z 8. apríla 2003 č. 969/2/2003-100 a uznesenia vlády SR č. 886 z 24. septembra 2003 (Číslo: 538/2003-100)
77. Smernica Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky o pravidlách pridelovania kvót pre cukor a kvót pre izoglukózu
78. Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív

74

Štatút

zo 6. novembra 2003 č. 3477/2003-100,

ktorým sa dopĺňa Štatút rezortnej komisie
Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky pre poskytovanie podpôr
v pôdohospodárstve č. 535/03 - 100 z 25.2.2003

Čl. I

Štatút rezortnej komisie Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky pre poskytovanie podpôr v pôdohospodárstve č. 535/03-100 sa dopĺňa takto:

V Čl. 3 ods. 5 sa v prvej vete za slovo "§ 22" vkladajú slová "ods. 4 až 9".

Čl. II

Tento štatút nadobúda účinnosť 15. novembra 2003.

Minister
Zsolt Simon, v. r.

Štatút

zo 6. novembra 2003 č. 3478/2003-100,

ktorým sa dopĺňa Štatút regionálnej komisie
Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky pre poskytovanie podpôr
v pôdohospodárstve č. 536/03 - 100 z 25. 2. 2003

Čl. I

Štatút regionálnej komisie Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky pre poskytovanie podpôr v pôdohospodárstve č. 536/03-100 sa dopĺňa takto:

V Čl. 3 ods. 5 sa v prvej vete za slovo "§ 21" vkladajú slová "§ 22 ods. 1 a 2".

Čl. II

Tento štatút nadobúda účinnosť 15. novembra 2003.

**Minister
Zsolt Simon, v. r.**

Doplnok č. 2**k Metodickému usmerneniu**

k niektorým ustanoveniam výnosu Ministerstva pôdohospodárstva SR z 21. januára 2003 č. 148/2/2003-100, o podpore podnikania v poľnohospodárstve, v znení výnosu z 8. apríla 2003 č. 969/2/2003-100 a uznesenia vlády SR č. 886 z 24. septembra 2003 (Číslo: 538/2003-100)

Doplnok k Metodickému usmerneniu bol vykonaný na základe mimoriadneho riešenia strát v poľnohospodárskej výrobe v roku 2003 z dôvodu nepriaznivých klimatických podmienok a cenových dopadov na poľnohospodárskej výrobky.

K ustanoveniu § 22

V § 22 sa v dôsledku mimoriadneho riešenia strát v poľnohospodárskej výrobe v roku 2003 z dôvodu nepriaznivých klimatických podmienok a cenových dopadov na poľnohospodárske výrobky sa mení znenie odseku 1 takto:

"(1) Podpora na úhradu časti škôd katastrofálneho rozsahu v rastlinnej výrobe sa môže poskytnúť len na škody, ktoré majú charakter nepoistiteľných škôd, t.j. škody, ktoré poisťovne nepoistovali v roku 2003 (sucho), a to do výšky 20 % škody. V prípade uzavretia poisťovnej zmluvy je potrebné túto zmluvu predložiť, týka sa len repky ozimnej. Žiadosti sa predkladajú najneskôr do 10. novembra kalendárneho roka."

Postup vyčíslenia:**Časť I - Vyčíslenie zníženia výroby**

Pod škodou katastrofálneho rozsahu v rastlinnej výrobe sa rozumie zníženie skutočnej výroby príslušnej plodiny v dôsledku sucha o viac ako 35 % oproti priemeru za okres vypočítaného za predchádzajúce 3 roky u danej plodiny, (ide o posledné 3 roky t.j. 2000, 2001 a 2002, nie 5 rokov s vylúčením najlepšieho a najhoršieho). V prípade, ak za niektorú plodinu nie je 3 ročný priemer v okrese, použije sa priemer za tie roky v rámci posledných troch rokov, kedy sa plodina pestovala (teda priemer dvoch rokov, alebo oproti predchádzajúcemu roku). Výpadok sa vyčíslí podľa Prílohy k časti I. t. j. tab. č. 1. za nasledujúce plodiny (teda podľa usmer-

nenia v auguste 2003): pšenica, jačmeň, raž, hrach, ovos, Triticale, repka ozimná (okrem vyorávok), repka jarná, horčica, ľan, šošovica, hrášok, mak, semeno lucerky, proso, jednoročné krmoviny, viacročné krmoviny, TTP. Okrem toho za kukuricu na zrno, cukrovú repu a slnečnicu podľa expertného odhadu úrody. Pri zelenine ide o cibuľu, mrkvu, petržlen, koreňovú papriku, uhorky naklad., pór, kapusta, karfiol, rajčiny priemyselné, kukuricu cukrovú, papriku, kel, brokolicu, kaleráb, zeler a repu červenú.

Časť II - Vyčíslenie straty

V prípade, ak za konkrétnu plodinu zodpovedá zníženie výroby podmienkam v predchádzajúcom odseku, potom základom pre výpočet škody sú podklady na ocenenie vlastných (farmárskych) nákladov osív v Sk v roku 2002, ostatné priame náklady v Sk/ha a ceny výrobcov v poľnohospodárstve SR spracované VÚEPP - ATIS za Slovensko v 33. týždni kalendárneho roka (za komodity neuvedené v ATIS-e údaje z cenovej štatistiky ŠÚ SR, priemer za mesiace 1 až 5) tak ako boli uvedené v metodickom usmernení k Vyčísleniu škôd spôsobených počasím, ktoré odbor rastlinných komodít zaslal na RO MO SR v auguste 2003, s doplnením prepočtov za kukuricu na zrno, cukrovú repu a slnečnicu (Prílohy k časti II, t.j. tab. č.1 vrátane metodických pokynov, príloha č. 1, 2 a 3).

Pre vyčíslenie straty kukurice a cukrovej repy platia nasledovné parametre:

Ostatné priame náklady v Sk/ha:

Komodita	Výrobná oblasť		
	kukuričná	repárska	zemiak.
Kukurica na zrno	11 500	10 600	9 400
Cukrová repa	21 100	17 600	16 100
Slnečnica	7 100	6 700	7 200

Ceny výrobcov v poľnohospodárstve SR (v Sk/t) spracované VÚEPP (ŠÚ SR priemer mesiacov 1.- 6.2003)

Komodita	Cena
Kukurica na zrno	4 000
Cukrová repa	priemerná realizačná cena podnikateľského subjektu
Slnečnica	priemerná realizačná cena podnikateľského subjektu

Plodiny, ktoré nie sú uvedené v cenníkoch ATIS budú ocenené priemernou realizačnou cenou podnikateľského subjektu, ktorú preukáže faktúrami.

Takto vypočíta podnikateľský subjekt stratu za každú uvedenú komoditu s výpadkom produkcie nad 35% trojročného okresného priemeru a spočíta straty za všetky komodity. Uvedený podklad priloží k žiadosti o podporu najneskôr do 18. 11. 2003. Straty predkladajú podnikateľské subjekty, ktoré predložili podklady za plodiny na základe usmernenia v auguste 2003, ďalej za plodiny nad rámec uvedených plodín (kukurica na zrno, cukrová repa a slnečnica) a podnikateľské subjekty, ktoré v auguste nepredložili požiadavku ale po zbilancovaní strát majú tiež straty nad 35 % okresného priemeru. RO MP SR prekontroluje výpočet a celkovú stratu - súčet za všetky komodity (bez 20 % - ného výpočtu možnej podpory) uvedie do zoznamu podľa podnikateľov (Prílohy k časti II, t.j. príloha č. 4), ktorý zašle do 20. 11. 2003 na odbor rastlinných komodít MP SR. RO MP SR zvlášť uvedie v zozname podnikateľské subjekty, ktoré predložili podklady za plodiny na základe usmernenia v auguste 2003, ďalej za plodiny nad rámec uvedených plodín (kukurica na zrno, cukrová repa a slnečnica) a podnikateľské subjekty, ktoré v auguste nepredložili požiadavku ale po zbilancovaní strát majú tiež straty nad 35% okresného priemeru, za každou kategóriou uvedie medzisúčet a nakoniec súčet týchto troch skupín podnikateľov..

Ministerstvo pôdohospodárstva SR na základe uvedených výpočtov celkových strát za celé Slovensko vyčíslí možnú výšku percentuálnej úhrady (max. do výšky 20 %) a rozpíše limit finančných prostriedkov na všetky RO MP SR s tým, že uvedené percento úhrady strát bude záväzná aj pre schválenie dotácie jednotlivým subjektom.

Tento doplnok nadobúda účinnosť dňom uverejnenia.

**Minister
Zsolt Simon, v.r.**

Úroda jednotlivých plodín

Tab. č. I.

Druh plodiny	Úroda z ha v tonách	3 ročný priemer okresu *	Výpočet % dosiahnutej úrody oproti 3 roč. priemeru

* RO MP SR poskytne poľnohospodárskym subjektom priemer za roky 2000,2001 a 2002

Vyčíslenie škôd spôsobených počasím

Príloha k časti II
Tabuľka č. 1 str. 1

Podnik: _____

Výrobná oblasť: _____

1.	5lodina	Merná jednotka	Pšenica	Jačmeň	Raz	Hrach	Ovos	Triticale
2.	Osiata plocha	ha						
3.	Vyoraná plocha	ha						
4.	Zberová plocha	ha						
	<i>intenzifikačné vstupy</i>							
5.	Osivá							
6.	nakúpené	tis. Sk						
7.	vlastné (Príloha č. 1)	tis. Sk						
8.	f^noivá							
9.	nakúpené	tis. Sk						
10.	<i>Chemické ochranné prostriedky</i>							
11.	spotreba celkom	tis. Sk						
12.	htenzifikačné vstupy spolu: na celú plochu	tis. Sk						
13.	Intenzifikačné vstupy spolu: na ha	Sk.ha ¹						
14.	Ostatné priame náklady: na ha	Sk.ha ¹						
15.	Ostatné priame náklady: na celú plochu (Príloha č.2)	tis. Sk						
16.	^riame náklady spolu	tis. Sk						
17.	Skutočný (očakávaný) ha výnos ⁿ	tha ⁿ¹						
18.	Skutočná (očakávaná) produkcia	t						
19.	Jednotková realizačná cena (Príloha č.3)	Sk.t'						
20.	Skutočný (očakávaný) finančný výnos na celú plochu	tis. Sk						
21.	³ oskytnutá dotácia na plodinu	Sk.ha ⁿ¹						
22.	^oskytnutá dotácia na plodinu celkom	tis. Sk						
23.	Príjmy celkom	tis. Sk						
24.	Zisk/strata	tis. Sk						
25.	Celkový dopad počasia (suma za všetky plodiny)	tis. Sk						

Dňa:

Podpis štatutárneho zástupcu

Skontroloval za RO MP SR

Podnik: _____

Výrobná oblasť: _____

Príloha k časti II
Tabuľka č. 1 str. 2

1.	Plodina	Merná jednotka	Repka ozimná	Repka jarná	a ďalšie plodiny		TTP	Celkom za plodiny
2.	Dsiata plocha	ha						
3.	Vyoraná plocha	ha						
4.	Zberová plocha	ha						
	Intenzifikačné vstupy							
5.	Osivá							
6.	nakúpené	tis. Sk						
7.	vlastné (Príloha č. 1)	tis. Sk						
8.	Hnojivá							
B.	nakúpené	tis. Sk						
10.	Chemické ochranné prostriedky							
11.	spotreba celkom	tis. Sk						
12.	Intenzifikačné vstupy spolu: na celú plochu	tis. Sk						
13.	Intenzifikačné vstupy spolu: na ha	Sk.ha ¹						
14.	Ostatné priame náklady: na ha	Sk. ha ¹						
15.	Ostatné priame náklady: na celú plochu (Príloha č.2)	tis. Sk						
16.	Priame náklady spolu	tis. Sk						
17.	Skutočný (očakávaný) ha výnos'	t. ha ¹						
18.	Skutočná (očakávaná) produkcia	t						
19.	Jednotková realizačná cena (Príloha č.3)	Sk. t						
20.	Skutočný (očakávaný) finančný výnos na celú plochu	tis. Sk						
21.	Poskytnutá dotácia na plodinu	Sk.ha ¹						
22.	Poskytnutá dotácia na plodinu celkom	tis. Sk						
23.	Príjmy celkom	tis. Sk						
24.	Zisk/strata	tis. Sk						
25.	Celkový dopad počasia	tis. Sk						

Dňa:

Podpis štatutárneho zástupcu

Skontroloval za RO MP SR

Vyčíslenie škôd spôsobených počasím

Pomocná tabuľka k jednotlivým plodinám

Podnik: _____

Príloha k časti II

Výrobná oblasť: _____

Tabuľka č.1 str.3

1.	Plodina: PŠENICA (a ďalšie plodiny)	Hodnota v SK	Číslo faktúry	Dátum nákupu	Dátum sejby	Dátum aplikácie
2.	Osivá, sadivá					
3.						
4.						
5.						
6.						
7.						
8.	Osivá, sadivá celkom					
9.	Hnojivá					
10.						
11.						
12.						
13.						
14.						
15.						
16.	Hnojivá celkom					
17.	Chemické ochranné prostriedky					
18.						
19.						
20.						
21.						
22.						
23.						
24.	Chemické ochranné prostriedky celkom					

Príloha: Fotokópie faktúr a výdajok zoradené podľa poradového čísla

Vyčíslenie škôd na TTP spôsobených počasím

Podnik: _____

Výrobná oblasť: _____

Príloha k časti II
Tabuľka č.1 str. 4

1.	Plodina	Merná jednotka	JRK	VRK	Lúky	
					Pasienky	
	<i>Intenzifikačné vstupy</i>					
2.	<i>Plocha, na ktorú bol vypracovaný projekt</i>	ha				
3.	<i>Osivá</i>	tis. Sk				
4.	<i>Hnojivá</i>					
5.	nakúpené	tis. Sk				
6.	<i>Chemické ochranné prostriedky</i>					
7.	spotreba celkom	tis. Sk				
8.	Intenzifikačné vstupy spolu: na celú plochu	tis. Sk				
9.	Intenzifikačné vstupy spolu: na ha	Sk.ha ⁿ¹				
10.	Ostatné priame náklady na zúrodnenie TTP na ha na základe účtovných dokladov	Sk.ha ⁿ¹				
11.	Ostatné priame náklady na zúrodnenie TTP na celú plochu na základe účtovných dokladov	tis. Sk				
12.	Priame náklady spolu	tis. Sk				
13.	Skutočný (očakávaný) ha výnos ⁿ	íha ⁿ¹				
14.	Skutočná (očakávaná) produkcia	t				
15.	Jednotková realizačná cena	Sk.t ⁿ¹	394*	328*	328*	
16.	Skutočný (očakávaný) finančný výnos na celú plochu	tis. Sk				
17.	Poskytnutá dotácia na TTP	tis. Sk				
18.	Príjmy celkom	tis. Sk				
19.	Zisk/strata	tis. Sk				
20.	Celkový dopad počasia na TTP	tis. Sk				

(*) cena sena v zelenom

Dňa: _____

Podpis štatutárneho zástupcu

Skontroloval za RO MP SR

Metodické vysvetlivky k obsahu tabuľky č. 1

Riadok 1:

plodina – konkrétna plodina, u ktorej je predpoklad zníženého výnosu v dôsledku počasia

Riadok 2:

osiata plocha v ha – ide o plochu hlásenú do štatistického výkazu **poľ-16-01** (modul č. 169) v prípade osevu ozimín a pri jarinách ide o plochu hlásenú do štatistického výkazu Osev 3 – 99 – osiate plochy poľnohospodárskymi plodinami

Riadok 3:

vyoraná plocha v ha

Riadok 4:

zberová plocha v ha: riadok 2 – riadok 3

Riadok 5:

osivá, sadivá

Riadok 6:

osivá nakúpené v tis. Sk

Riadok 7:

osivá vlastné v tis. Sk – príloha č. 1

Riadok 8:

hnojivá

Riadok 9:

hnojivá nakúpené v tis. Sk

Riadok 10:

chemické ochranné prostriedky

Riadok 11:

spotreba chemických prostriedkov celkom v tis. Sk

Riadok 12:

intenzifikačné vstupy spolu za celú plochu v tis. Sk - súčet riadkov 6, 7, 9, 11.

Riadok 13:

intenzifikačné vstupy spolu na hektár v Sk/ha

Riadok 14:

ostatné priame náklady v tis. Sk/ha

Riadok 15:

ostatné priame náklady na celú plochu v tis. Sk (výmera x normatív VÚEPP) – príloha č. 2

Riadok 16:

priame náklady spolu v tis. Sk: riadok 12 + riadok 15

Riadok 17:

skutočný (očakávaný) hektárový výnos v t/ha

Riadok 18:

skutočná (očakávaná) produkcia v t: riadok 4 x riadok 17

Riadok 19:

jednotková realizačná cena – príloha č. 3

Riadok 20:

skutočný (očakávaný) finančný výnos na celú plochu v tis. Sk: riadok 19 x riadok 18

Riadok 21:

poskytnutá dotácia na plodinu v Sk/ha

Riadok 22:

poskytnutá dotácia na plodinu celkom v tis. Sk

Riadok 23:

príjmy celkom v tis. Sk: riadok 20 + riadok 22

Riadok 24:

zisk/strata v tis. Sk

Riadok 25:

celkový dopad nepriaznivého počasia: suma za všetky plodiny v tis. Sk z riadku 24

Metodické pokyny
k vyčísleniu škôd na TTP spôsobených počasím

Riadok 1:

plodina – výmera

Riadok 2:

- intenzifikačné vstupy
- plocha, na ktorú bol vypracovaný projekt v ha

Riadok 3:

osivá v tis. Sk

Riadok 4:

hnojivá

Riadok 5:

nakúpené v tis. Sk

Riadok 6:

chemické ochranné prostriedky

Riadok 7:

spotreba celkom v tis. Sk

Riadok 8:

intenzifikačné vstupy spolu na celú plochu: (riadok 3 + riadok 5 + riadok 7) x 2

Riadok 9:

- intenzifikačné vstupy spolu na ha v Sk/ha

Riadok 10:

- ostatné priame náklady na zúrodnenie TTP na 1 ha na základe účtovných dokladov v Sk/ha

Dodatok:

Ostatné priame náklady na zúrodnenie TTP na 1 ha zahŕňajú len priame náklady, ktoré boli vynaložené na VRK a TTP v rámci schválených projektov, t. j. náklady na celé obdobie realizácie projektu, maximálne na 4 roky.

Riadok 11:

ostatné priame náklady na zúrodňovanie TTP na celú plochu na základe účtovných dokladov v tis. Sk

Riadok 12:

priame náklady spolu v tis. Sk

Riadok 13:

skutočný (očakávaný) hektárový výnos

Riadok 14:

skutočná (očakávaná) produkcia v t

Riadok 15:

jednotková realizačná cena v Sk/t

Riadok 16:

skutočný (očakávaný) finančný výnos na celú plochu v tis. Sk

Riadok 17:

poskytnutá dotácia na TTP v tis. Sk

Riadok 18:

príjmy celkom v tis. Sk

Riadok 19:

zisk/strata

Riadok 20:

celkový dopad počasia na TTP

Ocenenie vlastných (farmárskych) osív v Sk/ha v roku 2002

Príloha k časti II
Príloha č.1

Výrobok - Výsevok	Výrobné oblasti				
	K	R	Z	Z-O	H
Pšenica - 250 kg/ha	1 350	1 425	1 350	1 300	1 425
Raž - 250 kg/ha	1 375	1 725	1 425	1 300	1 600
Jačmeň - 220 kg/ha	1 166	1 232	1 342	1 320	1 364
Ovos - 220 kg/ha	1 210	1 232	1 210	1 056	1 430
Triticale - 250 kg/ha	1 300				

Pozn.: Výpočet bol stanovený na základe hektárového výsevku a ceny vlastného osiva (na základe vlastných nákladov)

Ocenenie vlastných osív ďalších komodít

			K	R	Z	Z-O	HO	SR
hrach iedlý	Sk/tona		9136					9136
	Výsevok v kg/ha		300					
	Hodnota v Sk/ha							
d'atelina červená	Sk/tona			77333	68944	58600	98250	75706
	Výsevok v kg/ha			26				
	Hodnota v Sk/ha							
lucerna	Sk/tona		85995	80893	77800			85499
	Výsevok v kg/ha		26					
	Hodnota v Sk/ha							
osivo tráv	Sk/tona		49533	44400	42944	38370	54755	50278
	Výsevok v kg/ha		200					
	Hodnota v Sk/ha							

Ortatné priame náklady v Sk/haPríloha k časti
Príloha č.2

Výrobok	Výrobná oblasť				
	Kukuričná	Repárska	Zemiakárska	Zemiak.-ovsená	Horská
Pšenica	10848	11 191	10153	10266	10340
Raz	7324	8707	6362	8103	12725
Jačmeň	9718	10208	9409	9558	9536
Ovos	6479	7458	7606	8217	9204
Repka	11 561	11 631	10662	12008	9396
Triticale	7324	8707	6362	8103	12725
Hrach	8559	7494	0	0	0
Ľan	10978				

Ostatné priame náklady upravené (v prípade, že ozimina bola vyoraná) v SK/ha

Výrobok	Výrobná oblasť				
	Kukuričná	Repárska	Zemiakárska	Zemiak.-ovsená	Horská
Pšenica	4400	4000	3900	4400	3700
Raz	1600	2500	2100	3200	5700
Jačmeň	3800	3800	3700	3600	4100
Repka	5600	4600	4400	5900	5500
Tritioale	3400				

Ostatné priame náklady v Sk/ha

Výrobok	Výrobná oblasť					SR
	Kukuričná	Repárska	Zemiakárska	Zemiak.-ovsená	Horská	
Ostatné iednoroč.krmoviny	5101	2087	2595	5787	5096	3837
Viacročné krmoviny	5942	3731	2928	2900	2752	4079

Ceny výrobkov v poľnohospodárstve SR (v Sk/t)

Príloha k časti II
Príloha č. 3 str. 1

Výrobok	fcok 2003, 33. Týždeň
Pšenica potravinárska	4000
Pšenica priemyselná	3500
Jačmeň sladovnícky	5000
Jačmeň kŕmny	3600
Raz potravinárska	4000
Ovos potravinársky (1)	4800
Ovos kŕmny (2)	4000
Repka ozimná	8800
Hrach jedlý	6 183
Hrach kŕmny	4538
Semeno horčice	10230
Šošovica	20200
Mak siaty	52 162
Semeno ľanu na technické spracovanie	10161
Šošovica jedlá	20294
Rosené ľanové stonky (3)	4680
Semeno ľanu na osivo (4)	17500

Prameň: ATIS Správa o trhu s obilninami a zemiakmi z 27.7. 2003, údaje sú zaokrúhlené

(1) a (2) Údaj je z cenovej štatistiky SÚ SR, priemer za mesiace 1-5

Prameň: SÚ SR

(3) (4) Prameň AT Tatry s.r.o. Spišská Bela

(3) podľa kvality dosahovanej v roku 2003

Ceny zeleniny od producentov
Ceny sa zisťovali v dňoch 21.7. - 24.7.2003

Príloha k časti II

Príloha č. 3str.2

Názov produktu		Zso	Sso	Vso	30.týž.
Mrkva skorá bez vňate	Min. cena	7,00	1*	-	7,00
	Max cena	10,00			10,00
	Priemer cena	9,00			9,25
Kapusta biela skorá	Min. cena	3,00	-	r	3,00
	Max cena	4,00			6,00
	Priemer cena	3,50			4,75
Kel hlávkový / ks	Min. cena	5,00	.	.	5,00
	Max cena	8,00			8,00
	Priemer cena	6,50			6,50
Karfiol / ks	Min. cena	12,00	-		12,00
	Max. cena	18,00			18,00
	Priemer cena	16,40			16,40
Rajčiaky rýchlené	Min. cena	8,00	r	13,00	8,00
	Max cena	18,00		17,00	18,00
	Priemer, cena	11,30		15,00	14,77
Paprika rýchlená	Min. cena	7,00		9,00	7,00
	Max. cena	12,00		15,00	15,00
	Priemer, cena	8,83		12,83	10,83
Uhorky šalátové	Min cena	1,00		3,00	1,00
	Max cena	2,00		5,00	5,00
	Priemer cena	1,50		4,00	2,75
Dyňa červená	Min. cena	3,00		1*	3,00
	Max cena	4,00			4,30
	Priemer. cena	3,75			4,03
Melón cukrový	Min cena	5,00	-	-	5,00
	Max. cena	8,00			8,00
	Priemer cena	6,42			6,42
Cibuľa skorá bez vňate	Min. cena	8,00	-	r	8,00
	Max. cena	10,00			10,00
	Priemer, cena	9,50			8,75
Zemiaky skoré	Min. cena	5,50	6,00	6,20	5,50
	Max cena	7,00	7,00	7,00	7,00
		6,39	6,50	6,60	6,50
Zdroj: VUEPP - ATIS					
1' - menej jako 3 údaje					

Upresnenie výšky strát v poľnohospodárskej výrobe v roku 2003

RO MP SR.....

Príloha k časti II
Príloha č. 4 str. 1

Komodity Subjekty	Pšenica	Jačmeň	Raz	Hrach	Ovos	Triti- cale	Repka ozimná	Repka jama	Hor- čica	Ľan	Šošo- vica	Hrášok	Mak	Semeno lucerky	Proso	JRK	VRK	TTP	Kukurica na zrno	Cukr. repa	Sneč- nica	Škody spolu	
Spolu za komodity																							

uvedené čísla sú v tis. Sk

Smernica

**Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky
o pravidlách pridelovania kvót pre cukor a kvót pre izoglukózu**

Ministerstvo pôdohospodárstva Slovenskej republiky, ako ústredný orgán štátnej správy pre organizovanie trhu s vybranými poľnohospodárskymi výrobkami, vydáva túto smernicu na účely vykonania § 8 nariadenia vlády Slovenskej republiky č. 89/2003 Z. z. o organizovaní trhu s cukrom (ďalej len „nariadenie“) pre pridelovanie kvót pre cukor jednotlivým výrobcom cukru a kvót pre izoglukózu jednotlivým výrobcom izoglukózy pre Intervenčnú poľnohospodársku agentúru Slovenskej republiky (ďalej len „agentúra“).

Čl. 1

(1) Kvótu pre cukor prideluje¹⁾ agentúra rozhodnutím každému výrobcovi cukru, ktorý spĺňa podmienky podľa osobitného predpisu²⁾.

(2) Kvótu pre izoglukózu prideluje agentúra rozhodnutím každému výrobcovi izoglukózy, ktorý spĺňa podmienky podľa osobitného predpisu²⁾.

(3) Pred pridelením kvóty podľa odseku 1 a 2 agentúra preverí splnenie podmienok podľa osobitného predpisu²⁾.

Čl. 2

(1) Kvóty pre cukor agentúra prideluje na základe podielov výrobcov cukru na celkovej domácej produkcii cukru počas obdobia hospodárskych rokov 1994/95 až 1998/99.

(2) Kvóty pre izoglukózu agentúra prideluje na základe podielov výrobcov izoglukózy na celkovej domácej produkcii izoglukózy počas obdobia jedného roka predchádzajúceho príslušnému hospodárskemu roku.

(3) Podiely výrobcov na domácej produkcii podľa odsekov 1 a 2 sú vyjadrené výrobnými koeficientmi v odseku 4 s prihliadnutím na

- a) bilanciu výroby, odbytu a spotreby cukru a izoglukózy na domácom trhu,
- b) plány reštrukturalizácie a modernizácie v oblasti spracovania cukrovej repy, výroby cukru a výroby izoglukózy v rozsahu nevyhnutnom na ich realizáciu,
- c) využitie existujúcich a predpokladaných spracovateľských kapacít,
- d) kapacitu a úroveň pestovateľského zázemia z hľadiska dostatku a kvality spracovateľskej suroviny.

(4) Výrobné koeficienty výrobcov cukru a výrobcov izoglukózy sú nasledovné:

Výrobca cukru	Výrobný koeficient
Eastern Sugar Slovensko, a. s.	0,338101
Považský cukor a. s.	0,206431
Slovenské cukrovary, a. s.	0,273201
Trnavský cukrovar, a. s.	0,182267

Výrobca izoglukózy	Výrobný koeficient
Amylum Slovakia spol. s r. o.	1,000000

(5) Výška množstiev garantovaných v rámci kvóty pre cukor sa určí ako súčin výrobného koeficientu výrobcu cukru a základného množstva výroby cukru³⁾.

(6) Výška množstiev garantovaných v rámci kvóty pre izoglukózu sa určí ako súčin výrobného koeficientu výrobcu izoglukózy a základného množstva výroby izoglukózy³⁾.

¹⁾ § 4 ods. 2 písm. c) zákona č. 491/2001 Z. z. o organizovaní trhu s vybranými poľnohospodárskymi výrobkami.

²⁾ § 8 ods. 2 nariadenia č. 89/2003 Z. z. o organizovaní trhu s cukrom.

³⁾ § 7 ods. 2 nariadenia č. 89/2003 Z. z.

(7) Pridelené kvóty pre cukor sú vyjadrené v tonách bieleho cukru.

(8) Pridelené kvóty pre izoglukózu sú vyjadrené v tonách sušiny.

Čl. 3

Na konanie sa vzťahujú všeobecné predpisy o správnom konaní⁴⁾.

⁴⁾ Zákon č. 71/1967 Zb. o správnom konaní (správny poriadok).

Čl. 4

Táto smernica nadobúda účinnosť 15. novembra 2003.

**Minister
Zsolt Simon, v.r.**

78

Zoznam

úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív

Na základe ustanovenia § 5 písm. l a § 14 ods. 3 zákona Národnej rady Slovenskej republiky SR č. 488/2002 Z.z. o veterinárnej starostlivosti a o zmene niektorých zákonov

v y d á v a m

Zoznam úradných metód a metódy laboratórnej diagnostiky potravín a krmív
- časť Mikrobiológia.

Nariaďujem

vykonávať laboratórnu diagnostiku úradných vzoriek potravín úradnými metódami, s platnosťou dňom vydania vo Vestníku MP SR.

Zmeny a doplnky úradných metód a nové úradné metódy vydá hlavný veterinárny lekár vo forme príloh.

**Prof. MVDr. Jozef Bíreš, DrSc., v.r.
hlavný veterinárny lekár**

ZOZNAM

ÚRADNÝCH METÓD LABORATÓRNEJ DIAGNOSTIKY POTRAVIN A KRMÍV

Časť MIKROBIOLÓGIA

kód	Názov metódy	Číslo predpisu
M 1.	Stanovenie celkového počtu mikroorganizmov metódou počítania kolónií v potravinách a krmivách	STN ISO 4833 (56 0083)
M 2.	Stanovenie celkového počtu mezofilných aeróbných a fakultatívne anaeróbných mikroorganizmov metódou najpravdepodobnejšieho počtu v potravinách	STN 56 0084
M 3.	Stanovenie počtu koliformných baktérií metódou najpravdepodobnejšieho počtu v potravinách a krmivách	STN ISO 4831 (56 0086)
M 4.	Stanovenie počtu koliformných baktérií metódou počítania kolónií v potravinách a krmivách	STN ISO 4832 (56 0085)
M 5.	Stanovenie počtu predpokladaných baktérií Escherichia coli metódou najpravdepodobnejšieho počtu v potravinách a krmivách	STN ISO 7251 (56 0093)
M 6.	Stanovenie počtu beta-d-glukuronidázopozitívnych Escherichia coli na chromogénnych médiách metódou počítania kolónií v potravinách	Úradné metódy laboratórnej diagnostiky potravín a krmív, príloha 1.
M 7.	Stanovenie počtu predpokladaných baktérií Escherichia coli metódou najpravdepodobnejšieho počtu v mlieku a mliečnych výrobkoch	STN ISO 11866-1 (57 0100)
M 8.	Stanovenie počtu predpokladaných baktérií Escherichia coli. metódou najpravdepodobnejšieho počtu s použitím 4-metylnumbeliferyl- β -D-glukoronidu (MUG) v mlieku a mliečnych výrobkoch	STN ISO 11866-2 (57 0100)
M 9.	Stanovenie počtu predpokladaných baktérií Escherichia coli. metódou počítania kolónií s použitím membrán v mlieku a mliečnych výrobkoch	STN ISO 11866-3 (57 0100)
M 10.	Metóda na dôkaz baktérií Escherichia coli 0 157 v potravinách a krmivách	STN EN ISO 16654 (56 0105)
M 11.	Stanovenie počtu kvasiniek a plesní metódou počítania kolónií v potravinách a krmivách	STN ISO 7954 (56 0087)
M 12.	Dôkaz baktérií rodu Salmonella v potravinách a krmivách	STN EN 12824 (56 0088) ISO 6579
M 13.	Stanovenie počtu koagulázopozitívnych stafylokokov (Staphylococcus aureus a ďalšie druhy) metódou s použitím Bairdovho-Parkerovho agarového média v potravinách a krmivách	STN EN ISO 6888-1 (56 0089)
M 14.	Stanovenie počtu koagulázopozitívnych stafylokokov (Staphylococcus aureus a ďalšie druhy) metódou s použitím agarového média s králičou plazmou a fibrinogénom v potravinách a v krmivách	STN EN ISO 6888-2 (56 0089)

M 15.	Dôkaz stafylokokového enterotoxínu reverznou pasívnou latexovou aglutináciou		Úradné metódy laboratórnej diagnostiky potravín a krmív, príloha 2
M 16.	Dôkaz botulinických toxínov a Clostridium botulinum v potravinách	v	STN 56 0090
M 17.	Stanovenie počtu baktérií Clostridium perfringens metódou počítania kolónií v potravinách a krmivách		STN EN 13401 (56 0091)
M 18.	Stanovenie počtu baktérií Bacillus cereus metódou počítania kolónií v potravinách a krmivách		STN ISO 7932 (56 0092)
M 19.	Stanovenie počtu baktérií rodu Lactobacillus v potravinách		STN 56 0094
M 20.	Stanovenie počtu slizotvorných baktérií rodu Leuconostoc		STN 56 0095
M 21.	Dôkaz baktérií čeľade Enterobacteriaceae s neselektívnym množením v potravinách a krmivách		STN ISO 8523 (56 0097)
M 22.	Stanovenie počtu baktérií čeľade Enterobacteriaceae bez resuscitácie metódou najpravdepodobnejšieho počtu a metódou počítania kolónií v potravinách a krmivách		STN ISO 7402 (56 0096)
M 23.	Dôkaz baktérií Vibrio parahaemolyticus v potravinách a krmivách		STN ISO 8914 (56 0098)
M 24.	Dôkaz predpokladaných patogénnych baktérií Yersinia enterocolitica		STN ISO 10273 (56 0099)
M 25.	Dôkaz termotolerantných baktérií rodu Campylobacter v potravinách a krmivách		STN EN ISO 10272 (56 0108)
M 26.	Stanovenie mezofilných aeróbných a fakultatívne anaeróbných mikroorganizmov v konzervách		STN 57 0161
M 27.	Stanovenie mezofilných anaeróbných mikroorganizmov v konzervách	v	STN 57 0162
M 28.	Stanovenie termofilných aeróbných a fakultatívne anaeróbných mikroorganizmov v konzervách		STN 57 0163
M 29.	Stanovenie termofilných anaeróbných mikroorganizmov v konzervách	v	STN 57 0164
M 30.	Dôkaz baktérií Listeria monocytogenes v mlieku a mliečnych výrobkoch		STN ISO 10560 (57 0103)
M 31.	Dôkaz baktérií Listeria monocytogenes v potravinách a krmivách		STN EN ISO 11290-1 (56 0101)
M 32.	Stanovenie počtu Listeria monocytogenes v potravinách a krmivách	a	STN EN ISO 11290-2 (56 0101)
M 33.	Stanovenie počtu jednotiek tvoriacich kolónie psychrotrofných mikroorganizmov metódou počítania kolónií vykultivovaných pri 6,5 °C v mlieku		STN ISO 6730 (57 0102)
M 34.	Stanovenie počtu baktérií rodu Pseudomonas v mäse a mäsových výrobkoch	a v	STN ISO 13720 (57 6021)
M 35.	Stanovenie počtu Brochotrix thermosphacta v mäse a mäsových výrobkoch	a v	STN ISO 13722 (57 6041)
M 36.	Dôkaz baktérií rodu Brucella v mlieku a v mliečnych výrobkoch		Úradné metódy laboratórnej diagnostiky potravín a krmív, príloha 3.
M 37.	Stanovenie počtu enterokokov v potravinách		STN 56 0100 Čl. 80, časť 6

M 38	Stanovenie počtu <i>Pseudomonas aeruginosa</i> v potravinách	STN 56 0100 Čl. 83
M 38.	Stanovenie počtu osmofilných kvasiniek v potravinách	STN 56 0100 Čl.86
M 39.	Stanovenie počtu β -hemolytických streptokokov v potravinách	STN 56 0100 Čl.96

M - 6	
	MIKROBIOLOGIA POTRAVIN Metóda na stanovenie počtu β -d-glukuronidázopozitívnych <i>Escherichia coli</i> na chromogénnych médiách - technika počítania kolónií vykultivovaných pri 44°C

1. Predmet a oblasť použitia

Táto metóda určuje všeobecné pokyny na stanovenie počtu β -d-glukuronidázopozitívnych *Escherichia coli* vo výrobkoch určených pre ľudskú výživu alebo pre kŕmenie zvierat. Metóda je založená na technike počítania charakteristických kolónií narastených na selektívnom chromogénnom médiu po inkubácii pri teplote 44 °C. Bola vypracovaná na základe návrhu normy ISO/DIS 16649-1999.

2. Odkazy na normy

STN ISO 6887 Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na prípravu riedení pri mikrobiologickom skúšaní.
 STN ISO 7218 Mikrobiológia potravín a krmív. Všeobecné pokyny na mikrobiologické skúšanie.

3. Termíny a definícia

Pre účely tejto metodiky sa používajú tieto definície:

- 3.1 β -d-glukuronidázopozitívne *Escherichia coli* - pri aplikácii tejto metódy sú to baktérie, ktoré vytvárajú na selektívnom tuhom médiu s prídavkom chromogénneho substrátu po inkubácii pri teplote 44 °C kolónie typické pre aktivitu β -d-glukuronidázy;
- 3.2 Stanovenie počtu β -d-glukuronidázopozitívnych *Escherichia coli* - pri aplikácii tejto metódy je to určenie počtu β -d-glukuronidázopozitívnych *Escherichia coli* v mililitre alebo grame vzorky.

4. Podstata skúšania

- 4.1 Do dvoch Petriho misiek sa naočkuje určitý objem skúšobnej vzorky, ak je skúšaný výrobok tekutý, alebo určitý objem základnej suspenzie pri ostatných výrobkoch. Inokulum sa zalieva chromogénnym selektívnym kultivačným médiom.

Rovnako sa postupuje pri očkovaní desaťnásobných riedení skúšobnej vzorky, alebo základnej suspenzie.

- 4.2 Naočkované misky sa inkubujú aeróbne pri teplote 44 ± 1 °C, 18-24 h.
- 4.3 Určí sa počet charakteristických t.j. modrých kolónií na jednotlivých miskách.
- 4.4 Výpočtom sa stanoví počet β -d-glukuronidázopozitívnych *Escherichia coli* v ml alebo v g vzorky.

5. Riediaci roztok a kultivačné médiá

5.1 Všeobecne

Bežnú laboratórnu prax pozri v ISO 7218

5.2 Riediaci roztok

Pozri STN ISO 6887 Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na prípravu riedení pri mikrobiologickom skúšaní.

5.3 Chromogénne tuhé kultivačné médium: tryptónový agar so žľčovými soľami obsahujúci kyselinu 5 - bromo-chloro-3-indolyl - β -d-glukurónovú - v skratke TBA s BCIG, alebo TBX (Tryptone Bile X-glucuronic médium)

5.3.1 Zloženie

tryptón	20,0 g
žľčové soli (purifikované)	1,5 g
kyselina 5 - bromo-chloro-3-indolyl - β -d-glukurónová (BCIG)	75 mg
dimethyl sulfoxid	3,0 ml
agar	12,0 až 18,0 g ¹⁾
voda	1 000 ml

¹⁾ podľa gélotvornej schopnosti agaru

5.3.2 Príprava

BCIG sa rozpustí v dimethyl sulfoxide.

Poznámka: Dimethyl sulfoxid je škodlivý pri vdýchnutí alebo kontakte. Odporúča sa pracovať v digestore.

Všetky zložky základu agarového média sa spolu s roztokom BCIG v dimethyl sulfoxide rozpustia vo vode a uvedú do varu. Hodnota pH sa upraví tak, aby po sterilizácii bola $7,2 \pm 0,2$ pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Sterilizuje sa v autokláve pri teplote $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 minút. Médium sa ihneď ochladí vo vodnom kúpeli (6.3) na $47 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pri príprave komerčného média sa postupuje podľa návodu výrobcu.

6. Prístroje, pomôcky

Poznámka - Jednorazové pomôcky, pokiaľ majú vhodnú špecifikáciu, sú prijateľnými náhradami za pomôcky sklenené.

Základné vybavenie mikrobiologického laboratória (pozri ISO 7218).

- 6.1 Prístroj na sterilizáciu horúcim vzduchom (sušiareň) alebo parou (autokláv)
- 6.2 Termostat s teplotou udržiavanou na $44 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$
- 6.3 Vodný kúpeľ s teplotou udržiavanou na $47 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$
- 6.4 Banky alebo fľašky s vhodným objemom
- 6.5 Delené pipety s objemom 10 ml s delením po 0,5 ml a s objemom 1 ml s delením po 0,1 ml
- 6.6 Petriho misky s priemerom 90 mm

7. Odber vzoriek

Je dôležité, aby laboratórium dostalo vzorku, ktorá je skutočne reprezentatívna a nebola počas prepravy a uskladnenia poškodená alebo zamenená.

Odber vzoriek nie je súčasťou metódy špecifikovanej v tomto metodickom pokyne. Ak neexistuje špecifická medzinárodná norma na odber vzoriek skúšaného výrobku, odporúča sa, aby sa zúčastnené strany na tomto postupe dohodli.

8. Príprava analytickej vzorky

Príprava analytickej vzorky sa vykonáva podľa špecifickej normy vhodnej pre skúšaný výrobok. Ak takáto špecifická medzinárodná norma neexistuje, odporúča sa, aby sa zúčastnené strany na tomto postupe dohodli.

9. Postup skúšania

9.1 Skúšobná vzorka, základná suspenzia a riedenie

Postupuje sa podľa STN ISO 6887 Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na prípravu riedení pri mikrobiologickom skúšaní.

9.2 Očkovanie a inkubácia

9.2.1 Do dvoch sterilných Petriho misiek sa sterilnou pipetou pipetuje po 1 ml skúšobnej vzorky, ak je tekutá, alebo po 1 ml základnej suspenzie v prípade ostatných výrobkov.

Rovnako sa postupuje pri očkovaní desaťnásobných riedení skúšanej vzorky alebo základnej suspenzie.

9.2.2 Inokulum sa zaliava 15 ml média TBA s BCIG podľa 5.3.2 ochladeného na 47 °C vo vodnom kúpeli, dobre sa premieša a nechá stuhnúť na chladnej vodorovnej ploche.

Poznámka: Doba medzi prenesením inokula a zaliatím médiom nemá presiahnuť 15 minút.

9.2.3 Inkubácia

Naočkované misky sa obrátené hore dnom uložia do termostatu pri teplote 44 ± 1 °C po dobu 18-24 h. Celková doba inkubácie nesmie byť dlhšia ako 24 h.

UPOZORNENIE: V prípade možnosti výskytu oslabených kolónií, inkubovať 4h pri 37 °C pred inkubáciou pri teplote 44 ± 1 °C 18-24 h. Neinkubovať pri teplote nad 45 °C.

9.3 Počítanie kolónií

Po ukončení inkubácie (9.2.3) sa vyberú Petriho misky, na ktorých vyrástlo menej ako 150 charakteristických kolónií (menej ako 300 všetkých narastených kolónií).

Poznámka: Typické kolónie sú modré

10. Vyjadrenie výsledkov

10.1 Metóda výpočtu - obecný prípad

- misky ktoré obsahujú 15 až 150 kolónií β -d-glukuronidázopozitívnych *Escherichia coli*
Vypočíta sa hodnota N ako počet β -d-glukuronidázopozitívnych *Escherichia coli* v ml alebo v g výrobku podľa tohto vzorca:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

kde

$\sum C$ je súčet kolónií β -d-glukuronidázopozitívnych *Escherichia coli* spočítaných na všetkých vybraných miskách

n_1 počet misiek z prvého riedenia použitého na výpočet

n_2 počet misiek z druhého riedenia použitého na výpočet

d riediaci faktor zhodný s prvým použitým riedením

V objem inokula očkovaného na každú Petriho misku

Výsledok sa zaokrúhli tak, aby obsahoval dve číslice rôzne od nuly (pozri ISO 7218).

Výsledok sa vyjadří ako počet β -d-glukuronidázopozitívnych *Escherichia coli* v ml alebo v g výrobku, a to ako číslo 1,0 až 9,9 násobené 10^x , kde x je príslušná mocnina 10.

10.2 Odhad nízkych počtov.

10.2.1 Ak na dvoch miskách naočkovaných základnou suspenziou alebo neriedenou vzorkou vyrástlo menej ako 15 charakteristických kolónií, vypočíta sa počet *E. coli* vo vzorke použitím nasledujúceho vzorca:

$$N_E = \frac{\sum c}{V_n n d}$$

kde

$\sum C$ je súčet kolónií β -d-glukuronidázopozitívnych *Escherichia coli* spočítaných na dvoch miskách

n počet misiek

d riediaci faktor zhodný s prvým použitým riedením

V objem inokula očkovaného na každú Petriho misku

Výsledok sa zaokrúhli tak, aby obsahoval dve číslice rôzne od nuly (pozri ISO 7218).

10.2.2 Ak na dvoch miskách naočkovaných základnou suspenziou alebo neriedenou vzorkou nevyrástla žiadna charakteristická kolónia, vyjadří sa výsledok nasledujúcim spôsobom:

menej ako $1/d$ predpokladaných *E. coli* na ml alebo g výrobku

kde d je riediaci faktor zhodný s prvým použitým riedením.

10.2.3 Ak pre dve misky s prvým riedením platí, že počet modrých aj netypických kolónií je vyšší ako 300 a na miskách s nasledujúcim riedením s celkovým počtom narastených kolónií menším ako 300 sa žiadne modré kolónie nevykrytli vyjadří sa výsledok nasledujúcim spôsobom:

menej ako $1/d_2$ a viac ako $1/d_1$ na ml alebo g výrobku

10.2.4 Ak je na miskách s riedením d_1 celkový počet narastených kolónií vyšší ako 300 bez výskytu modrých kolónií a pri riedení d_2 je celkový počet kolónií menej ako 300 bez výskytu modrých kolónií vyjadruje sa výsledok nasledujúcim spôsobom:

menej ako $1/d_2$ predpokladaných E. coli na ml alebo g výrobku.

10.3 Metódy výpočtu - špeciálne prípady

10.3.1 V prípade, že počet modrých kolónií je vyšší ako 150 pri dvoch miskách v prvom riedení d_1 a pri ďalšom riedení je počet pod 15 modrých kolónií:

- Ak je počet modrých kolónií od 150 do 167, používa sa výpočet podľa bodu obecný prípad (10.1)
- Ak je počet modrých kolónií nad 167, vezme sa do úvahy iba počet kolónií na miskách z druhého riedenia a výpočet sa vykoná podľa bodu odhad nízkych počtov (10.2)

10.3.2V prípade, že na každej miske je počet modrých kolónií vyšší ako 150 pri všetkých riedeníach vyjadri sa výsledok takto:

viac ako $150/d$ predpokladaných E. coli na ml alebo g výrobku, kde d = faktor najvyššieho použitého riedenia.

10.3.3V prípade, že iba dve misky z najvyššieho riedenia obsahujú menej ako 150 modrých kolónií, vypočíta sa počet predpokladaných E. coli ako aritmetický priemer počtu kolónií na týchto dvoch miskách s použitím vzorca:

$$N' = \frac{\sum c}{V \cdot n \cdot d}$$

kde

- $\sum C$ je súčet kolónií β -D-glukuronidázopozitívnych Escherichia coli spočítaných na dvoch miskách, z ktorých aspoň jedna obsahuje minimálne modrých kolónií
- n počet misiek
- d riediaci faktor zhodný s použitým riedením
- V objem inokula očkovaného na každú Petriho misku

Výsledok sa zaokrúhli tak, aby obsahoval dve číslice rôzne od nuly (pozri ISO 7218).

10.2 Vzájomná zhoda výsledkov skúšok

Pozri ISO 7218.

11. Protokol o skúške

V protokole o skúške sa musí uviesť použitá metóda skúšania, doba inkubácie a získané výsledky a jednoznačne uvedený použitý spôsob ich vyjadrenia. Protokol musí obsahovať aj všetky podrobnosti pracovného postupu, ktoré nie sú uvedené v tomto pokyne alebo sú považované za voliteľné a ďalej všetky podrobnosti o okolnostiach, ktoré by mohli mať vplyv na výsledky skúšania.

Protokol o skúške musí obsahovať všetky informácie potrebné na úplnú identifikáciu vzorky.

M - 15

MIKROBIOLÓGIA POTRAVÍN

Dôkaz enterotoxínu *Staphylococcus aureus* metódou reverznej pasívnej latexovej aglutinácie
(RPLA)

1. Predmet a oblasť použitia

Táto metodika určuje referenčný postup pre dôkaz stafylokokového enterotoxínu A,B,C,D v potravinách a vo filtrátoch kultúr.

2. Definícia

Stafylokokový enterotoxín je pomerne jednoduchý polypeptid s molekulárnou hmotnosťou asi 35 000 daltonov. Podľa antigénnych vlastností je známych 8 typov, označených A,B,C (s tromi podtypmi C₁,C₂ a C₃), D, E, G, H a I. Najčastejšie produkujú kmene enterotoxín typ A (asi 45 % z enterotoxinogénnych kmeňov). Niektoré kmene *Staphylococcus aureus* produkujú viac typov enterotoxínu. Enterotoxín spôsobuje najtypickejšiu bakteriálnu intoxikáciu - stafylokokovú enterotoxikózu. Pre vyvolanie ochorenia dospelého človeka stačí jeden mikrogram purifikovaného toxínu.

3. Podstata skúšania

Podstatou skúšania je reverzná pasívna aglutinácia na latexe (RPLA). Pri tejto metóde protilátka naviazaná na partikuly reaguje so solubilným antigénom. Partikuly (v tomto prípade častice latexu) sami o sebe nehrajú rolu v tejto reakcii a preto sú pasívne. Väzba latexových častíc pri špecifickej reakcii antigénu s protilátkou vyústí do viditeľnej latex - aglutinačnej reakcie.

4. Krátky popis

Polystyrénové latexové partikuly sú senzibilizované purifikovaným antisérom odobratým z králikov osobitne imunizovaných individuálne purifikovanými stafylokokovými enterotoxínmi A,B,C a D. Tieto latexové partikuly aglutinujú v prítomnosti príslušného enterotoxínu. Súčasťou testu je aj kontrolný reagent z latexových partikulí senzibilizovaných globulínami neimunizovaných králikov. Test sa robí na mikrotitračných platniach s V-jamkami. Riedenie extraktov z potravín alebo z bakteriálnych kultúr sa robí v piatich radoch jamiek, potom sa pridá primerané množstvo latexovej suspenzie do každej jamky a obsah sa premieša. Ak sú prítomné stafylokokové enterotoxíny typu A,B,C a D, dôjde k aglutinácii, ktorá sa zviditeľní vytvorením mriežkovej štruktúry. Po ustálení sa vytvorí difúzna vrstva na báze jamky. Ak enterotoxín nie je prítomný alebo je jeho koncentrácia nízka, latexová vrstva sa nevytvorí a v jamke je viditeľný malý plný krúžok. K testu je pridávané riedidlo, ktoré obsahuje hexamatafosfát sodný, ktorý redukuje výskyt nešpecifických reakcií s niektorými zložkami potravín.

5. Prístroje, pomôcky, chemikálie a kultivačné médiá

5.1 Súprava RPLA

- 5.1.1 TD 901 Latex sensibilizovaný antienterotoxínom A
Latexová suspenzia sensibilizovaná špecifickými králičími IgG prtilátkami proti stafylokokovému enterotoxínu A
- 5.1.2 TD 902 Latex sensibilizovaný antienterotoxínom B
Latexová suspenzia sensibilizovaná špecifickými králičími IgG prtilátkami proti stafylokokovému enterotoxínu B
- 5.1.3 TD 903 Latex sensibilizovaný antienterotoxínom C
Latexová suspenzia sensibilizovaná špecifickými králičími IgG prtilátkami proti stafylokokovému enterotoxínu C
- 5.1.4 TD 904 Latex sensibilizovaný antienterotoxínom D
Latexová suspenzia sensibilizovaná špecifickými králičími IgG prtilátkami proti stafylokokovému enterotoxínu D
- 5.1.5 TD 905 latexová kontrola
latexová suspenzia sensibilizovaná neimúnnym králičím globulínom
- 5.1.6 TD 906 kontrolný roztok stafylokokového enterotoxínu A
- 5.1.7 TD 907 kontrolný roztok stafylokokového enterotoxínu B
- 5.1.8 TD 908 kontrolný roztok stafylokokového enterotoxínu C
- 5.1.9 TD 909 kontrolný roztok stafylokokového enterotoxínu D
fosfátový puľovaný solný roztok s obsahom albumínu z bovinného séra a hexametafosfátu sodného

Súpravy RPLA sa skladujú a manipuluje sa s nimi podľa pokynov výrobcu.

- 5.2 miešač alebo homogenizátor
- 5.3 odstredivka s otáčkami 3 000 ot/min.
- 5.4 mikromixér
- 5.5 membránová filtračná jednotka s jednorázovými nízkoproteínovými filtrami s poréznosťou 0,2-0,45 μm (napr. Millipore SLGV)
- 5.6 vlhká komôrka
- 5.7 mikrotitračné platne s V-jamkou s krytom
- 5.8 fixná alebo vymeniteľná pipeta s hrotmi na 25 μl
- 5.9 25 ml kvapadlo
- 5.10 0,85 % roztok chloridu sodného
- 5.11 roztok hypochloritu sodného (nad 1,3 % w/w)
- 5.12 tryptónový sójový bujón (napr. Oxoid CM 129)

6. Vzorky

6.1 Vzorky potravín

Je možné testovať široký okruh potravín, ale príprava extraktov určitých potravín môže vyžadovať určité modifikácie. Hlavnou požiadavkou je získať nezakalený beztukový extrakt. Je potrebné zachovať nízky faktor zriedenia kvôli optimálnej citlivosti testu. Ak si povaha vzorky vyžaduje vyššie zriedenie, výsledok môže byť ovplyvnený nižšou citlivosťou testu.

Citlivosť testu sa uvádza pre koncentráciu enterotoxínu 0,5 ng/ml skúšaného extraktu. Ak je extrakt z potraviny pripravený pri riedení 1:1 riedidlom, je následne citlivosť 1 ng/g pôvodného potravinového základu. Limit detekcie sa bude meniť v závislosti od špecifických požiadaviek na riedenie tej-ktorej vzorky potraviny alebo suroviny. Koncentrácia enterotoxínu v extrakte môže byť ovplyvnená rôznorodosťou použitých metód.

- 6.1.1 Príprava extraktu
- 6.1.2 Vzorky s hmotnosťou 10 g rozmixovať s 10 ml 0,85 % roztokom chloridu sodného v miešači alebo v homogénizátore.
- 6.1.3 Rozmixovanú vzorku odstrediť pri 900 g 4 °C 30 minút. Ak nie je k dispozícii odstredivka s chladením, treba pred odstredeníím vzorku zchladíť na 4 °C
- 6.1.4 Supernatant filtrovať cez 0,2-0,45 µm filter s membránou, viazúcou proteín a získaný filtrát použiť na stanovenie enterotoxínu

6.2 Filtráty z kultúr

- 6.2.1 Stafylokoky získané z potravín metódou podľa STN ISO 6888 Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na stanovenie počtu baktérií *Staphylococcus aureus*. Metóda počítania kolónií.
- 6.2.2 Izolované typické bakteriálne kolónie inokulovať do tryptónového sójového bujónu
- 6.2.3 Inkubovať pri 37 °C 18-24 hodín s miešaním
- 6.2.4 Po pomnožení odstrediť pri 900 g 20 minút pri 4 °C alebo filtrovať cez 0,2-0,45 µm filter s membránou, viazúcou proteín a získaný filtrát použiť na stanovenie enterotoxínu

6.3 Kontrolná vzorka

Každá rekonštituovaná toxínová kontrola spôsobí aglutináciu s príslušným senzibilizovaným latexom. Použitie latexových kontrol poslúži ako referenčná pozitívna kontrola pri interpretácii výsledkov testu. Tieto kontroly možno používať z času na čas aj na zisťovanie správnej funkčnosti latexu. Toxínové kontroly nemajú špecifikovanú hladinu a preto nemôžu byť použité pre kvantifikáciu obsahu toxínu vo vyšetrovanej vzorke.

7. Postup skúšania

- 7.1 Pred použitím dôkladne premiešať latexové činidlá a riedidlo, aby sa získala homogénna suspenzia . Na rekonštitúciu kontrolných činidiel pridať po 0,5 ml riedidla (TD 910) do každej nádobky, jemne miešať až do rozpustenia obsahu.
- 7.2 Platňu nachystať tak, aby každý rad obsahoval 8 jamiek. Pre každú vzorku je potrebných 5 radov.
- 7.3 Pomocou pipety alebo kvapkadla dať do každej jamky z piatich radov riedidlo po 25 ml.
- 7.4 Pridať po 25 ml vyšetrovanej vzorky do prvej jamky vo všetkých piatich radoch.
- 7.5 Za použitia zriedovača alebo pipety počnúc prvou jamkou každej rady zobrať 25 ml obsahu a prenášať do každej jamky vo všetkých piatich radoch až po siedmu jamku, tak, aby ostala posledná jamka s obsahom len riedidla. Robíme tak dvojnásobné riedenie.
- 7.6 Do každej jamky v prvom rade pridať 25 µl latexu sensibilizovaného antienterotoxínom A.
- 7.7 Do každej jamky v druhom rade pridať 25 µl latexu sensibilizovaného antienterotoxínom B.
- 7.8. Do každej jamky v treťom rade pridať 25 µl latexu sensibilizovaného antienterotoxínom C.
- 7.9 Do každej jamky v štvrtom rade pridať 25 µl latexu sensibilizovaného antienterotoxínom D.
- 7.10 Do každej jamky v piatom rade pridať 25 µl latexovej kontroly.
- 7.11 Platne dôkladne premiešať otáčaním v mikromixéri, alebo v ruke. Z jamiek sa nesmie nič vyliať.

- 7.12 Na zabránenie vyparovania zakryť platňu krytom. Je vhodné umiestniť platňu do vlhkej komôrky. Ponechať platňu v kľude, na rovnej ploche bez otrasov pri izbovej teplote po dobu 20-24 hodín. Pre dobré odčítanie je vhodné položiť počas inkubácie platňu na čierny papier.
- 7.13 Centrifugačné skúmavky, membránové filtre, platne, kryty a špičky do pipiet sterilizovať v atokláve pri 121° C alebo dezinfikovať v hypochloritovom roztoku (nad 1,3 % w/w).
- 7.14 Extrakty z kultúr, z potravín a toxínové kultúry vložiť do hypochloritového roztoku (nad 1,3 % w/w).

8. Vyhodnotenie

Stanoviť prítomnosť alebo neprítomnosť aglutinácie každej jamky v každom rade oproti čiernemu pozadiu.

9. Vyjadrenie výsledkov

Vzhľad výslednej aglutinácie posúdiť podľa nasledovnej ilustrácie:



- výsledky vyhodnotené ako +, ++ a +++ sú pozitívne
- výsledky z radov s jamkami obsahujúcimi latexovú kontrolu musia byť negatívne
- pri nešpecifickej aglutinácii posúdiť výsledok ako pozitívny za predpokladu, že reakcia so senzibilizovaným latexom bola pozitívna pri vyššom riedení skúšanej vzorky, ako je pri latexovej kontrole
- posledné jamky v každom rade musia byť negatívne, ak sa vyskytne pozitívna reakcia v niektorej z týchto jamiek, reakcia sa považuje za chybnú.

10. Protokol o skúške

V protokole o skúške sa musí uviesť použitá metóda skúšania a získané výsledky a jednoznačne uvedený použitý spôsob ich vyjadrenia. Protokol musí obsahovať aj všetky podrobnosti pracovného postupu, ktoré nie sú uvedené v tomto pokyne, alebo sú považované za voliteľné a ďalej všetky podrobnosti o okolnostiach, ktoré by mohli mať vplyv na výsledky skúšania.

Protokol o skúške musí obsahovať všetky informácie potrebné na úplnú identifikáciu vzorky.

M-36

MIKROBIOLÓGIA POTRAVÍN

Metóda pre dôkaz baktérií rodu *Brucella* v mlieku a v mliečnych výrobkoch

1. Predmet a oblasť použitia

Táto metodika určuje všeobecné pokyny pre metódu na dôkaz baktérií rodu *Brucella* v surovom kravskom, ovčom a kozom mlieku a v syroch zo surového kravského, ovčieho a kozieho mlieka. Metóda je založená na technike získania charakteristických kolónií narastených na selektívnom médiu po inkubácii pri teplote 37 °C. Bola vypracovaná na základe publikácií: KLEER, J.: Untersuchungen zum Brucellose-Infektionsrisiko durch Weißkäse - Kultureller Erregernachweis - Erhitzungsnachweis, Technologische Aspekte. Dizertačná práca, Berlín 1988 a KLEER, J., P. TEUFEL, P., H.-J. SINELL: Kultureller Nachweis von *Brucella* spp. in Salzlake-Weißkäsen. Zborník z odborného seminára, Garmisch-Partenkirchen, 29.9.-1.10.1999.

2. Odkazy na normy

STN ISO 7218 Mikrobiológia potravín a krmív. Všeobecné pokyny na mikrobiologické skúšanie.

3. Termíny a definícia

Pre účely tejto metodiky sa používajú tieto definície:

- 3.1 suspektná brucella - sú baktérie, ktoré vytvárajú na selektívnom tuhom médiu charakteristické kolónie a ktoré vykazujú pri osvetlení charakteristické zafarbenie a popísané biochemické a sérologické vlastnosti, ak sú testy vykonané podľa tejto metódy.
- 3.2 *Brucella* - suspektná brucella, ktorá bola biochemicky a sérologicky identifikovaná referenčným laboratóriom.
- 3.3 dôkaz rodu *Brucella* - určenie prítomnosti alebo neprítomnosti týchto baktérií v definovanom množstve výrobku, ak sú testy vykonané podľa tejto metódy.

4. Podstata skúšania

Dôkaz baktérií rodu *Brucella* vyžaduje 5 po sebe nasledujúcich fáz (pozri aj tabuľku č.1).

4.1 Selektívne množenie v tekutom médiu

Skúšaná vzorka sa očkuje do bujónu pre množenie brucel a inkubuje sa v mikroaeróbnom prostredí (5 až 10 % CO₂) pri 37 °C po dobu 3 až 5 dní

4.2. Izolácia - Vyočkovanie na tuhé selektívne médium pre zisťovanie prítomnosti suspektných kolónií

Každá z kultúr získaných podľa 4.1 sa vyočkuje na predpísané tuhé selektívne médium, t.j. na agar podľa FARRELLA. Po inkubácii pri 37 °C po dobu 3 až 5 dní v mikroaeróbnom prostredí (5 až 10 % CO₂) sa zisťuje prítomnosť kolónií suspektných ako kolónie brucel.

4.3 Skrining na základe morfológických znakov a potvrdenie suspektných brucel

4.3.1 Skrining na základe morfológických znakov

4.3.2 Skrining na základe osvetlenia

4.4 Subkultivácia suspektných kolónií získaných podľa 4.3 na selektívne tuhé médium, Brucella agar pri 37°C po dobu 3 dní na potvrdenie príslušnosti k brucelám

4.4.1 Katalázový test

4.4.2 Farbenie podľa Grama

4.4.3 Mikroskopické vyšetrenie

4.4.4 Sklíčková aglutinácia s monošpecifickými A a M – antisérami

4.4.5 Aglutinácia s 0,1 % vodným roztokom akriflavínu

4.5 Odovzdanie na identifikáciu do referenčného laboratória

Kultúru, ktorá vykazuje znaky svedčiace pre rod *Brucella* označí laboratórium ako suspektnú brucelu a odovzdá na ďalšiu identifikáciu referenčnému laboratóriu, napr. laboratóriu klinickej mikrobiológie.

5. Kultivačné médiá a činidlá

5.1 Všeobecne

Bežnú laboratórnu prax pozri v STN ISO 7218 Mikrobiológia. Všeobecné pokyny pre mikrobiologické skúšanie.

5.2 Médium pre selektívne množenie – Bujón podľa Farrella pre množenie brucel

5.2.1 Základ média: Bacto Brucella bouillon (DIFCO), alebo Brucella bujón

5.2.1.1 Zloženie:

tryptón	10,0 g
mäsový peptón získaný peptickým trávením	10,0 g
glukóza	1,0 g
kvasničný extrakt	2,0 g
chlorid sodný (NaCl)	5,0 g
hydrosiričitan sodný (NaHSO ₃)	0,1 g
voda	1 000 ml

5.2.1.2 Príprava

Zložky média alebo kompletne dehydrované médium sa rozpustí vo vode, ak je to potrebné varom. Hodnota pH sa upraví tak, aby po sterilizácii bola 7,0 ± 0,2. Sterilizuje sa v autokláve pri teplote 121 °C 15 minút.

5.2.2 Výživné prídavky:

konské sérum 5 % v/v - suplement OXOID SR 35

roztok antibiotík – suplement OXOID SR 83

cycloheximid	100(mg/l)
nystatin	100 000 IU/l
bacitracín	25 000 IU/l
polymyxin B	5 000 IU/l
vancomycín	20 mg/l
kyselina nalidixinová	5 mg/l

5.3 Selektívne tuhé médium podľa Farrella

5.3.1 Základ média:

Brucella-agar -basis - OXOID CM 169

Pozn.: Firma OXOID ponúka aj Blod agar base č.2 (CM 271), alebo Columbia agar base (CM 331) alebo Brucella Base (CM 691)

Príprava médií podľa návodu výrobcu.

výživné prídavky:

konské sérum 5 % v/v - OXOID SR 35

roztok antibiotík - suplement - OXOID SR 83

cycloheximid	100(mg/l)
nystatin	100 000 IU/l
bacitracin	25 000 IU/l
polymyxin B	5 000 IU/l
vancomycin	20 mg/l
kyselina nalidixinová	5 mg/l

Obsah flaštičky so suplementom treba riediť s 10 ml zmesi vody a etanolu 1:1.

5.3.2 Príprava roztokov pre suplement:

cycloheximid (Sigma)

1,0 g rozpustí v 5 ml acetónu, zriediť destilovanou vodou v pomere 1:20,

10 ml=100 mg

nystatin (Sigma, 4.800 IU/mg)

208,3 mg sa rozpustí v 2 ml dimetylformamidu, pred použitím zriediť s destilovanou vodou v pomere 1:10

1 ml=5 000 IU

bacitracin (Serva, 55 000-65 000 IU/g)

4,167 g sa rozpustí v 50 ml destilovanej vody

1 ml=5 000 IU (4584-5417 IU)

polymyxín B (polymyxin B-sulfat, Sigma)

6,3 mg sa rozpustí v 10 ml destilovanej vody,

1 ml=5 000 IU

vancomycín (Vancomycin-hydrochlorid, Sigma)

50 mg sa rozpustí v 10 ml destilovanej vody

1 ml= 5 mg

kyselina nalidixinová (Sigma)

500 mg sa rozpustí v 10 ml 0,5 N NaOH

bezprostredne pred použitím sa zriedi s destilovanou vodou v pomere 1:10

1 ml pracovného roztoku = 5 mg

Poznámka - Agar a bujón podľa Farrella veľmi dobre potláčajú rast stafylokokov, aeromonád, streptokokov, baktérie z čelade Enterobacteriaceae a ostatných gram-negatívnych tyčíniek.

6. Prístroje a pomôcky

Poznámka - Jednorazové pomôcky, pokiaľ majú vhodnú špecifikáciu, sú prijateľnými náhradami za pomôcky sklenené.

Základné vybavenie mikrobiologického laboratória (pozri STN ISO 7218)

- 6.1 Prístroj na sterilizáciu horúcim vzduchom (sušiareň) alebo parou (autokláv)
- 6.2 Termostat s možnosťou udržiavania teploty na $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- 6.3 Vodný kúpeľ alebo termostat s možnosťou udržiavania teploty na $40\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
- 6.4 pH meter s presnosťou merania $\pm 0,1$ jednotky pH pri teplote 25 °C
- 6.5 Anaerostat vybavený katalyzátorom a vyvíjačom plynov (Gaspak) pre vytvorenie prostredia s 5-10 % CO_2
- 6.6 Banky, skúmavky alebo fľaše s vhodným objemom
- 6.7 Odmerné valce
- 6.8 Delené pipety s objemom 10 ml s delením 0,5 ml a s objemom 1 ml s delením 0,1 ml
- 6.9 Bakteriologické kľúčky vyrobené zo zliatiny platiny a irídia alebo zo zliatiny chrómu a niklu s priemerom približne 3 mm
- 6.10 Petriho misky s priemerom od 90 mm do 100 mm

7. Odber vzoriek

Je dôležité, aby laboratórium dostalo vzorku, ktorá je skutočne reprezentatívna a nebola počas prepravy a uskladnenia poškodená alebo zamenená.

Odber vzoriek nie je súčasťou metódy špecifikovanej v tomto metodickom pokyne. Ak neexistuje špecifická medzinárodná norma na odber vzoriek skúšaného výrobku, odporúča sa, aby sa zúčastnené strany na tomto postupe dohodli.

8. Príjem a uchovávanie vzoriek

Príprava analytickej vzorky sa vykonáva podľa špecifickej normy vhodnej pre skúšaný výrobok. Ak takáto špecifická medzinárodná norma neexistuje, odporúča sa, aby sa zúčastnené strany na tomto postupe dohodli.

9. Postup skúšania

(Pozri schému v tabuľke)

9.1 Skúšobná vzorka

Pozri STN ISO 6887 a niektorú špecifickú medzinárodnú normu vhodnú pre skúšaný výrobok

9.2 Selektívne množenie

Vzorka o hmotnosti 25 g sa zhomogenizuje s 225 ml bujónu podľa Farrella o teplote 40 °C po dobu 2 minút. Potom sa suspenzia inkubuje 3 až 5 dní pri 37 °C .

Odporúča sa používať 1,5 l Erlenmayerove banky, ktoré umožňujú veľkou povrchovou plochou výmenu plynov a tým zabraňujú disociácii brucel. Ďalej sa odporúča aeróbná inkubácia a paralelne s mikroaeróbnou s pridaním 5 až 10 % CO_2 najmä pri prvej izolácii a pre druh B.abortus.

9.3 Očkovanie na tuhé selektívne médium a zisťovanie prítomnosti suspektných kolónií

Po ukončení stupňa množenia v selektívnej tekutej pôde sa kultúra premieša (obsahom banky sa pomaly zakrúži), z hladiny sa odoberie plná očkovačia kľúčka a inokulum sa preniesie na povrch tuhého média podľa Farrella. Inkubuje sa 3-5 dní pri 37 °C . Ďalej sa odporúča aeróbná inkubácia a paralelne s mikroaeróbnou s pridaním 5 až 10% CO_2 najmä pri prvej izolácii a pre druh B.abortus.

Poznámka - Odporúčame používať na prenesie inokula namiesto kľúčky pipety pre jednorázové použitie alebo nedelené 1 ml pipety a odoberať po jednej kvapke (obvyklý objem je jedna dvadsatina ml).

Inokulum sa rozočkuje tak, aby sa vytvorili dobre izolované kolónie.

9.4. Skríning suspektných kolónií

Suspektné kolónie: priemer 2 – 4 mm, drobné, hladké, lesklé, ploché, okrúhlejšie kontúry, mierne zakalené, niekedy medovej farby, neskoršie majú svetlohnedé sfarbenie. Rast v primokultúre je pomalší, viditeľný na 3 - 4 deň, niekedy až 5.deň. Pri pozorovaní proti svetlu sú priehľadné, svetlomedovej farby. Pri pozorovaní v odrazenom svetle sú belasejšie až modrasto-sivej farby, slabo nepriehľadné.

9.4.1 Subkultivácia suspektných kolónií

Pre potvrdenie sa z každej Petriho misky vyberie najmenej po piatich kolóniách, ktoré sa považujú podľa 9.4 za suspektné.

Pokiaľ je na jednej miske menej suspektných kolónií ako päť, vyberú sa na potvrdenie všetky suspektné kolónie.

Každá z vybraných kolónií sa rozočkuje na povrch misiek s predsušeným živným agarom, Brucella agar, tak, aby sa umožnil rast dobre izolovaných kolónií.

Inkubuje sa 3 dni pri 37 °C. Po 3 dňoch sa testujú na príslušnosť k brucelám.

9.4.2 Potvrdenie príslušnosti k rodu Brucella

9.4.2.1 Katalázová reakcia

Typická kolónia sa suspenduje na sklíčku v 3% roztoku peroxidu vodíka (roztok peroxidu vodíka, 3 % obj.). Katalázopozitívne kmene sa vyznačujú tvorbou bubliniek plynu.

9.4.2.2 Farbenie podľa Grama

S typickou kolóniou sa vykoná farbenie podľa Grama. Brucella sp. sú gramnegatívne často kokovité, krátke (často bipolárne sa farbiace) pleomorfné tyčinky, veľkosti 0,2 x 0,8 mm.

9.4.2.3 Sklíčková aglutinácia s monošpecifickými A a M – antisérmi

Na dôkaz prítomnosti antigénu A a M baktérií rodu Brucella sa použije aglutinácia kolónie čistej kultúry s vhodnými sérami na podložnom skle po vylúčení spontánne aglutinujúcich baktérií v 0,1 % roztoku akriflavínu.

9.4.2.4 Aglutinácia s čerstvým roztokom akriflavínu

Pre vylúčenie spontánne aglutinujúcich kmeňov sa použije 0,1 % vodný roztok akriflavínu

9.5 Odovzdanie na identifikáciu do referenčného laboratória

Kultúru, ktorá vykazuje skrínigové znaky podľa 9.4 a podľa 9.4.2 označí laboratórium mikrobiológie potravín ako suspektnú brucelu a odovzdá ju na druhovú identifikáciu do referenčného laboratória, napr. laboratóriu klinickej mikrobiológie. Súčasne s kmeňmi odovzdá laboratórium mikrobiológie potravín sprievodnú správu, ktorá musí obsahovať zistené vlastnosti podľa 9.4. a podľa 9.4.2 a všetky ostatné informácie potrebné pre úplnú identifikáciu vzorky.

10. Vyjadrenie výsledku

V súlade s výsledkami referenčného laboratória sa vyjadří prítomnosť alebo neprítomnosť baktérií rodu Brucella v skúšobnej vzorke s hmotnosťou 25 g alebo 25 ml skúšaného výrobku.

11. Protokol o skúške

V protokole o skúške sa musí uviesť použitá metóda skúšania, doba inkubácie a získané výsledky a použitý spôsob ich vyjadrenia. Protokol musí obsahovať aj všetky podrobnosti pracovného postupu, ktoré nie sú uvedené v tomto pokyne, alebo sú považované za voliteľné a ďalej všetky podrobnosti o okolnostiach, ktoré by mohli mať vplyv na výsledky skúšania.

Protokol o skúške musí obsahovať všetky informácie potrebné na úplnú identifikáciu vzorky.

Schéma postupu skúšky

Selektívne pomnoženie

25 ml mlieka/homogenizácia 25 g syra s 225 ml bujónu podľa Farrella pri 40 °C
Inkubácia: 3 až 5 dní 37 °C, mikroaeróbne (5 až 10 % CO₂)

Izolácia

frakcionované rozočkovanie kľúčkou na agar podľa Farrella
Inkubácia: 3 až 5 dní 37 °C, mikroaeróbne (5 až 10 % CO₂)

Preskúšanie suspektných kolónií

morfológia kolónií (po 4-dňovej inkubácii):
Ø 2-4 mm, okrúhle, hladké okraje, povrch hladký, lesklý
pozorovanie proti svetlu: priesvitné, svetlomedová farba
v odrazenom svetle: belavé až svetlosivé, slabo priesvitné

Subkultivácia suspektných kolónií na brucelovom agare (37 °C, 3 dni)

Katalázový test (pozitívny)
Farbenie podľa Grama (gramnegatívne krátke tyčinky)
Mikroskopické vyšetrenie stereomikroskopom: (6-20x zväčšenie), dôležitá
paralelná pozitívna kontrola
Skličková aglutinácia s monošpecifickými A a M - antisérami
Agglutinácia s 0,1 % vodným roztokom akriflavínu