



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ



Fakulta zemědělská a technologická  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích



# Postup rychlého stanovení obsahu laktoferinu v mléce rutinní metodou infračervené spektrometrie

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

## Zpracovali:

Hana Nejeschlebová<sup>1</sup>, Oto Hanuš<sup>1</sup>,  
Klára Bartáková<sup>2</sup>, Eva Samková<sup>3</sup>,  
Jaroslav Kopecký<sup>1</sup>, Radoslava Jedelská<sup>1</sup>

1. Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Praha
2. Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie VETUNI, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie.
- 3 Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů

**ISBN: 978-80-88390-12-1**

**Prosinec 2024**

## **Vydavatel:**

**Pro:** Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Veterinární univerzitu Brno a Jihočeskou univerzitu v Českých Budějovicích

**Vydal:** MILCOM a.s., Ke Dvoru 12a, Praha 6, 16000

## **Místo vydání:**

Praha

## **Forma vydání:**

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF.

## **Zveřejněno na webové stránce:**

<https://agronavigator.cz/metodiky/veterinari-lekarstvi>

## **Pořadí vydání:**

1. vydání

## **Podíl autorů na tvorbě metodiky:**

51 % Hana Nejeschlebová  
14 % Oto Hanuš  
14 % Klára Bartáková  
11 % Eva Samková  
5 % Jaroslav Kopecký  
5 % Radoslava Jedelská

## **Podíl firem na tvorbě metodiky:**

75 % Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha  
14 % Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie VETUNI, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie  
11 % Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů

## **Podíl projektů na tvorbě metodiky:**

75 % MZe NAZV ZEMĚ QK21010326  
25 % RO 1424

## **Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:**

- 1) **Odborník z daného oboru:** Ing. Václava Genčurová, Ph.D., pracoviště: laboratoř, Vápenka Vitošov s.r.o., manažer jakosti akreditované laboratoře, odborník na analýzy zemědělských materiálů včetně mléka, vody a stavebních hmot
- 2) **Pracovník státní správy:** MVDr. Jana Hornáčková, pracoviště: Státní veterinární správa, odborný rada, odbor veterinární hygieny a ochrany veřejného zdraví

## **Dedikace na projekt:**

Metodika je výsledkem řešení:

- a) Výzkumného projektu č. QK21010326 s názvem „Možnosti ovlivňování výskytu inhibičních látek v mléce jako účinný nástroj vedoucí k podpoře zdraví zvířat a ke zvyšování kvality a bezpečnosti potravin“
- b) Podpory na rozvoj výzkumné organizace č. RO1424

## Obsah

Cíl metodiky.....	4
Vlastní popis metodiky .....	4
Současný stav problematiky .....	4
Materiál a metody .....	5
Vzorkování.....	5
Laboratorní analýzy .....	6
Statistické postupy .....	7
Výsledky a diskuze .....	8
Charakteristika validačních souborů A a B .....	8
Validace původního kalibračního modelu pro stanovení laktoferinu nepřímou metodou MIR-FT (firemní kalibrace).....	10
Význam laktoferinu jako ukazatele zdraví mléčné žlázy .....	12
Vývoj nového kalibračního modelu pro stanovení laktoferinu nepřímou metodou MIR-FT13	
Závěr .....	14
Srovnání „novosti postupů“ a předání metodiky .....	15
Popis uplatnění metodiky.....	16
Ekonomické aspekty.....	16
Seznam použité literatury .....	17
Seznam publikací, které předcházely metodice .....	19
Podklady pro registraci do RIV.....	19
Příloha.....	20

## Cíl metodiky

Metodika si klade za cíl poskytnout doporučený postup při zavádění rutinního nepřímého stanovení obsahu laktoferinu (LF) v syrovém kravském mléce metodou infračervené spektrometrie ve střední oblasti spektra s Fourierovou transformací (MIR-FT). K dosažení tohoto cíle byly stanoveny následující dílčí cíle:

- 1) na dvou souborech s odlišnou metodikou odběru individuálních vzorků mléka popsat validaci stávajícího kalibračního modelu pro stanovení LF nepřímou metodou MIR-FT (firemní kalibrace Bentley Instruments Inc., Chaska, MN, USA), který byl vyvinutý s využitím metody ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) jako referenční metody;
- 2) popsat vhodnou kalibrační sadu vzorků mléka pro stanovení LF;
- 3) popsat vztah LF v mléce k vybraným mléčným ukazatelům ve vztahu ke zdraví mléčné žlázy dojníc.
- 4) popsat nový kalibrační model pro stanovení LF nepřímou metodou MIR-FT, který jako referenční metodu využívá vysoceúčinnou kapalinovou chromatografii.

## Vlastní popis metodiky

### *Současný stav problematiky*

LF je transportní glykoprotein vázající železo, který patří do skupiny transferinů. Poprvé byl objeven v kravském mléce a postupně byla jeho přítomnost potvrzena u celé řady savců. LF je přítomen v mukózních sekretech (mléko, sliny, slzy, sekret nosní dutiny, žluč aj.) a nachází se rovněž v sekundárních granulích neutrofilních leukocytů a krevní plazmě (Superti 2020).

LF je znám zejména pro svůj antibakteriální efekt vůči patogenním bakteriím (Bullen et al. 1972; Arnold et al. 1982). U některých probiotických bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* bylo naopak zjištěno, že LF a jeho peptidy růst těchto bakterií podporují (Chen et al. 2013, 2017). Byly také popsány antivirové, antifungální, imunomodulační, antiinflamatorní či antikarcinogenní účinky LF (Superti 2020). Bovinní LF je schválen jako bezpečná složka potravin Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA 2012) i Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA 2016), díky čemuž představuje potenciál pro produkci mléčných výrobků s přidanou hodnotou.

Obsah LF ve zralém kravském mléce zdravých dojníc byl uveden v rozmezí 31,8 až 485,6 mg/l (průměr 115,4 mg/l; Cheng et al. 2008). Kolostrum obsahuje 1 500 až 5 000 mg/l LF (McGrath et al. 2016), v průběhu 72 hodin od počátku produkce kolostra potom množství LF prudce klesá, zvýšení následuje až v pozdějších fázích laktace (Valk-Weeber et al. 2020). LF, který se účastní imunitní odpovědi mléčné žlázy na mikrobiální infekci, je ve zvýšeném množství přítomen v mléce dojníc postižených mastitidou. Hagiwara et al. (2003) zaznamenali obsah LF u dojníc se subklinickou mastitidou od 300 do 1 300 mg/l (průměr 500 mg/l). Soyeurt et al. (2012) uvedli, že současné využití údajů o počtu somatických buněk a obsahu LF vedlo ke zpřesnění diagnostiky mastitid.

Rutinní stanovení LF v mléce tak představuje potenciál pro sběr informací v rámci rutinní kontroly užitkovosti a jejich využití pro zjišťování zdravotního statutu zvířat či výživové hodnoty mléka. Stanovení LF bylo popsáno zejména metodami jednoduché radiální

imunodifúze (Hagiwara et al. 2003), ELISA (Chaneton et al. 2008) a vysoce účinné kapalinové chromatografie (Tsakali et al., 2019), které jsou však pro sériová stanovení příliš pracné. Preferovanou metodou dnešní doby pro rutinní stanovení obsahu mléčných složek MIR-FT, která v oblasti mlékařství nachází uplatnění zejména v laboratořích pro kontrolu užitkovosti, zpeněžování mléka a mlékárenských provozech. Vedle hlavních komponent je běžné metodou MIR-FT stanovovat v mléce také močovinu (Oliveira et al. 2012), ketolátky (Kneysel et al. 2010), kyselinu citronovou (Hanuš et al. 2014) či mastné kyseliny (Samková et al. 2019). Portfolio možných analýz mléka metodou MIR-FT (efektivních kalibrací) se navíc dále rozšiřuje, zmíněny byly např. detailnější skladba mléčných bílkovin (Bonfatti et al. 2016), kyselina orotová (Zaalberg et al. 2020), metabolický stav krav (Ho et al. 2020), metanové emise krav (Vanlierde et al. 2016), diagnostika březosti (Khanal et al. 2022) či falšování mléka (Yao et al. 2023).

Také možnost měření obsahu LF metodou MIR-FT byla již dříve uvedena. V pilotní studii Soyeurt et al. (2007) bylo dosaženo crossvalidačního korelačního koeficientu determinace ( $R^2_{cv}$ ) 0,75, přičemž kalibrační soubor obsahoval 69 vzorků kravského mléka z Valonského regionu v Belgii. V následující rozsáhlejší studii Soyeurt et al. (2012), kde kalibrační sadu tvořilo 2499 vzorků kravského mléka získaných ze stád v Belgii, Irsku a Skotsku, bylo dosaženo  $R^2_{cv}$  0,71. V obou zmíněných studiích byla jako metoda pro získání referenčních hodnot LF zvolena ELISA a pro zisk spekter přístroje MilkoScan FT6000 (Foss, Hillerød, Denmark). Soyeurt et al. (2020) provedli na rozsáhlém datovém souboru ( $n = 6\ 619$ ), který obsahoval data z různých zemí (Belgii, Irsko, Skotsko, Anglie, Německo, Francie, Lucembursko), komparativní studii 4 algoritmů strojového učení k predikci obsahu LF v kravském mléce z MIR-FT spekter. Jako nejvhodnější byl k predikci LF identifikován model využívající kombinaci metody částečných nejmenších čtverců a umělé neurální sítě, který vykázal validační korelační koeficient determinace ( $R^2_v$ ) 0,60.

V současnosti nám nejsou známy jiné práce zabývající se stanovením LF v mléce metodou MIR-FT. Taktéž nám není známo, že by v České republice bylo v mléčných laboratořích zavedeno použití této metody pro stanovení LF.

## *Materiál a metody*

### **Vzorkování**

Byly odebírány individuální vzorky dojnic dle dvou odlišných metodik, čímž vznikly k následným validačním hodnocením také dva soubory (A a B). V souboru A byly dojnice pro odběr vzorků specificky a cíleně selektovány. Charakteristiky mléčných ukazatelů (zejména PSB) jsou zde záměrně ovlivněny směrem k horšímu zdravotnímu stavu dojnic z hlediska pravděpodobnosti výskytu subklinických mastitid. Vzorkování dojnic souboru B bylo naopak náhodné. V obou souborech bylo vzorkování prováděno dle předpisu kontroly užitkovosti a vzorky byly po odběru konzervovány chladem (teplota  $\leq 6$  °C), analýza proběhla do 24 hodin od odběru.

Vzorky souboru A ( $n = 120$ ) byly odebírány ve čtyřech chovech dojeného skotu v České republice (ČR) v oblasti severní Moravy. Zahrnuta byla dvě stáda dojnic plemene České strakaté (Czech Fleckvieh, CF, nadmořská výška chovu 375 a 530 m) a dvě stáda plemene

Holštýn (Holstein, H, 258 a 262 m). Korespondující průměrné roční teploty činily: 7,3; 7,4; 9,2; 8,8 °C. Průměrná dojivost stád dojníc (pro počet krav, ks) za normovanou laktaci (305 dní) byla: CF 7 583 (120) a 5 941 kg mléka (297); H 12 105 (439) a 9 557 kg (277). Vzorky byly odebrány během jednoho roku (prosinec 2022 až září 2023). Celkem byly provedeny 4 odběry (CF a H v zimním krmném období a CF a H v letním krmném období), při každém vzorkování bylo odebráno 30 vzorků. Odběry tak při tvorbě referenční sady vzorků mléka výsledkově zahrnovaly průměrné podmínky chovu dojníc pro ČR z hlediska vlivu sezóny, plemene a dojivosti. Při každém odběru a následné selekci individuálních vzorků mléka při pravidelné kontrole užitkovosti byla zahrnuta 1/3 vzorků od krav na první laktaci a 2/3 vzorků ze stáda na 2. a vyšší laktaci, maximálně na 6. laktaci. Byly vždy vzorkovány dojnice od 10 do 200 dnů laktace tak, aby cca 1/3 vzorků pocházela od krav s počtem somatických buněk (PSB) do 300 tis./ml a 2/3 od krav s PSB nad 300 tis./ml, maximálně do 5 000 tis./ml v předchozím kontrolním dni (cca před dvěma týdny) pro zajištění potřebné větší variability PSB (z kalibračních důvodů) v referenční sadě vzorků.

Vzorky souboru B (n = 91) byly odebrány v chovu dojeného skotu, který se nachází v ČR v kraji Vysočina, v nadmořské výšce 485 m s průměrnou roční teplotou 7,4 °C. Dojnice holštýnského plemene (n = 435) jsou chovány ve volném ustájení se stlanými boxy a celoročně krmeny TMR (celková směsná krmná dávka). Průměrná roční dojivost je 11 553 kg mléka. Individuální vzorky mléka byly získávány v období od srpna do listopadu (2021 - 2023) a v březnu 2024. Vzorky byly odebrány u dojníc do 20. dne po porodu (variabilní pořadí laktace 1-6). Celkem bylo provedeno 8 odběrů, v rámci každého odběru bylo získáno přibližně 11 vzorků.

### *Laboratorní analýzy*

Ve všech vzorcích bylo provedeno stanovení LF metodou vysoceúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s iontově-párovacím činidlem (HPLC). Vzorky mléka byly odstředěny (3000 otáček/15 minut/5 °C) a z povrchu byl mechanicky odebrán tuk, 50 ml takto upraveného vzorku bylo vysráženo 10% kyselinou octovou na hodnotu pH 4,6. Po odstředění byla syrovátka oddělena od kaseinu, zmrazena na teplotu -18 °C a před vlastním stanovením rozmrazena a přefiltrována přes nylonový membránový filtr (0,22 µm) do vialek pro HPLC stanovení. Vlastní stanovení bylo provedeno kapalinovým chromatografem Alliance 2695 s PDA 2996 detektorem (Waters, USA) a kolonou Poroshell 300SB-C8, 2,1 x 75 mm, 5 µm (Agilent Technologies, USA). Bylo použito gradientové eluce a průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min (voda/acetónitril/kyselina trifluoroctová), teplota kolony činila 50 °C, objem nástřiku byl 5 µL. Analyty byly detekovány při 205 nm. Pro sběr a vyhodnocování dat a chod kapalinového chromatografu byl použit software Empower 2 (Waters, USA).

Všechny vzorky byly dále změřeny metodou MIR-FT za použití přístroje DairySpec FT (Bentley Instruments, Chaska, MN, USA). Při kalibrační a kontrolní činnosti bylo postupováno v rámci norem: ČSN EN ISO/IEC 17025; ČSN 57 0536; ČSN 57 0530; ČSN ISO 8196-1 (570536); ČSN ISO 8196-2 (570536) a ČSN ISO 8196-3 (570536). MIR-FT metodou:

- byly vzorky analyzovány na obsah LF s využitím firemní kalibrace Bentley Instruments Inc. (Chaska, MN, USA);

- byla zaznamenána spektra vzorků pro možnost vývoje nové kalibrace využívající referenční hodnoty LF získané metodou HPLC;
- byly vzorky analyzovány na obsahu tuku (%), hrubých bílkovin (%), kaseinu (%), monohydrátu laktosy (%), tukuprosté sušiny (%), celkové sušiny (%), močoviny (mg/l), volných mastných kyselin (mg/100g tuku) a kyseliny citronové (%).

Ve všech vzorcích bylo také provedeno stanovení PSB (tis/ml), měrné vodivosti (mS/cm) a bodu mrznutí (BMM; °C).

PSB byl stanoven metodou průtokové cytometrie na přístroji Somacount 300 (Bentley Instruments, Chaska, MN, USA) v souboru A a přístrojem Fossomatic 7 (Foss Analytical A/S, Hillerød, Dánsko) v souboru B. Přístroje byly pravidelně kalibrovány (ČSN EN ISO 13366-1 a ČSN EN ISO 13366-2) a kontrolovány.

Měrná vodivost byla stanovena na konduktometru Hanna Instruments HI5321-02 (Woonsocket, USA). Přístroj byl kalibrován příslušným solným roztokem (KCl; 10,2 mS /cm) pro měření každé sady vzorků mléka.

BMM byl stanoven kryoskopem Cryo-Star automatic (Funke-Gerber, Německo). Přístroj byl pravidelně kalibrován standardy solných roztoků (Funke-Gerber, Německo).

Laboratorní analýzy probíhaly na pracovištích:

- Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., pracoviště Šumperk (všechny analýzy kromě stanovení LF metodou HPLC a PSB v souboru B);
- Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie (stanovení LF metodou HPLC);
- Českomoravská společnost chovatelů, a.s., Laboratoř pro rozbor mléka Brno - Tuřany (stanovení PSB v souboru B).

### *Statistické postupy*

Soubory A a B byly popsány základními statistickými parametry (aritmetický průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient, minimum, maximum a medián). Vyhodnocení bylo provedeno s použitím programu MS Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA). PSB a LF byly pro výpočty použity v původní a logaritmičtě transformované formě.

Pro hodnoty LF stanovené metodou HPLC ( $LF_{HPLC}$ ) a MIR-FT ( $LF_{MIR}$ ) byly v souborech A a B vypočteny lineární regrese, koeficienty korelace ( $r$ ) a determinace ( $R^2$ ). Pro vztah mezi  $LF_{HPLC}/LF_{MIR-FT}$  a vybranými mléčnými ukazateli (PSB, laktosa, měrná vodivost) byla taktéž provedena korelační analýza. Významné korelace (s pravděpodobností nulové hypotézy  $< 0,05$ ) byly konvenčně (\*) označeny.

V rámci validace původního (firemního) kalibračního modelu byla dále pro soubory A a B provedena k-násobná křížová validace, neboť tvorba nového validačního souboru a jeho analýza referenční metodou (HPLC) by byla v případě LF velmi nákladná. Proto byl proveden opakovaný výpočet korelace mezi výsledky referenčních (HPLC) a nepřímých (MIR-FT) stanovení LF v mléce, kdy byl alternativně postupně z výpočtu vyřazován určitý počet vzorků ( $n = 10$  ze 120, jednotlivé výpočty tedy byly pro  $n = 110$ ). Z řady výsledků byl pak vypočten

průměrný korelační koeficient ( $r$ ), jako validační k původně dosaženému korelačnímu koeficientu kalibrace LF.

Ve spolupráci s pracovníky R&D firmy Bentley Instruments Inc. (Chaska, MN, USA) pány Craigem Parsonsem a Gavinem Thompsonem byl pro stanovení LF nepřímou MIR-FT metodou vyvinut nový kalibrační model, přičemž byla využita zaznamenaná spektra souborů A a B a k nim příslušné referenční hodnoty získané metodou HPLC (za použití statistické metody částečných nejmenších čtverců (PLS)). Soubory A a B byly pro tento účel sloučeny do 1 souboru (C), ze kterého bylo vyřazeno 5 odlehlých bodů. Kalibrační soubor C tak obsahoval 206 vzorků.

### *Výsledky a diskuze*

#### **Charakteristika validačních souborů A a B**

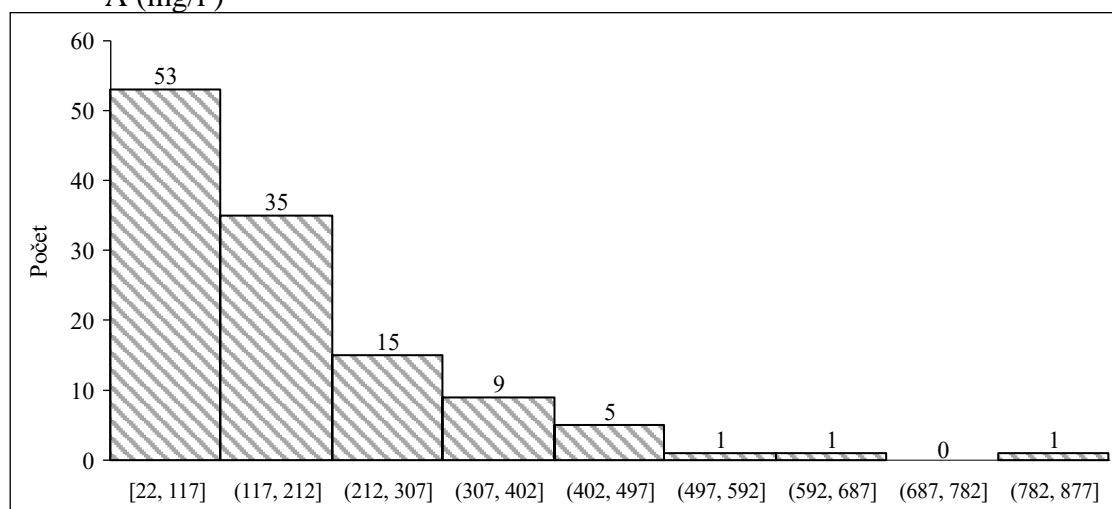
Charakteristika mléčných ukazatelů souborů A a B je uvedena v Tab. 1. Je patrné, že vyšších hodnot LF bylo dosaženo v souboru A než souboru B (aritmetický průměr  $LF_{HPLC}$ : A  $167,4 \pm 133,8$  mg/l vs B  $96,1 \pm 91,2$  mg/l). Uvedené odpovídá zvolené metodice odběru vzorků, kdy do souboru A byly ze 2/3 vybírány vzorky s PSB nad 300 tis./ml a v souboru B byl výběr z tohoto hlediska náhodný. Cheng et al. (2008) uvedli, že ke zvyšování LF v mléce dochází až při překročení SCS (skóre PSB) 4 ( $141 \text{ tis./ml} \geq \text{PSB} > 283 \text{ tis./ml}$ ), tedy v bodě, kdy je zvýšená pravděpodobnost infekce mléčné žlázy. Je tedy logické, že soubor A, který obsahoval značně vyšší podíl (35,8 %; 43/120) vzorků s PSB přesahujícím tuto hranici než soubor B (18,7 %; 17/91), vykazoval také vyšší obsah LF a rovnoměrnější rozdělení hodnot LF (Obr. 1 a Obr. 2).

Tab. 1 Charakteristika mléčných ukazatelů souborů A a B pro validaci původního (firemního) kalibračního modelu

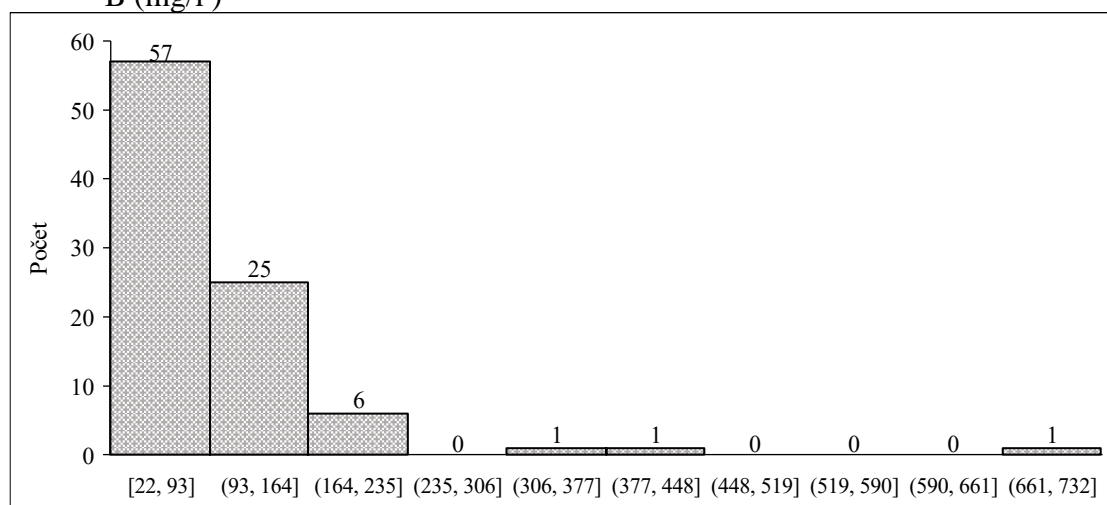
Ukazatel	Soubor A (n = 120)						Soubor B (n = 91)					
	x	SD	RSD	Min	Max	Med	x	SD	RSD	Min	Max	Med
<b>LF<sub>HPLC</sub></b>	167,4	133,8	79,9	21,5	792,6	130,1	96,1	91,2	94,8	21,6	709,4	67,1
<b>log LF<sub>HPLC</sub></b>	2,0998	0,3366	16,0	1,3333	2,8991	2,1144	1,8789	0,2790	14,9	1,3335	2,8509	1,8266
<b>LF<sub>MIR-FT</sub></b>	228,2	58,9	25,8	104,9	495,0	222,6	216,1	44,9	20,8	120,7	330,5	218,0
<b>log LF<sub>MIR-FT</sub></b>	2,3443	0,1110	4,7	2,0210	2,6946	2,3475	2,3250	0,0925	4,0	2,0815	2,5191	2,3385
<b>T</b>	4,04	0,74	18,3	2,41	6,13	4,02	5,14	0,94	18,3	3,4	7,95	5,06
<b>HB</b>	3,52	0,38	11	2,74	4,52	3,48	3,40	0,41	12,0	2,63	4,44	3,46
<b>K</b>	2,76	0,44	16,1	1,71	3,94	2,73	2,56	0,42	16,6	1,82	3,71	2,55
<b>L</b>	4,86	0,23	4,7	4,09	5,26	4,9	4,87	0,3	6,2	3,81	5,44	4,91
<b>TPS</b>	9,12	0,36	4	8,32	10,03	9,09	8,98	0,45	5,0	7,6	10,03	9
<b>TS</b>	13,84	1,05	7,6	11,36	16,56	13,89	14,83	1,13	7,6	12,2	17,44	14,82
<b>M</b>	205,3	89,7	43,7	8,8	422,6	205,1	251,3	106,9	42,6	53,3	506	247,9
<b>VMK</b>	0,63	0,10	15,1	0,42	0,96	0,63	0,53	0,08	14,7	0,23	0,76	0,53
<b>KC</b>	0,22	0,04	19,1	0,11	0,38	0,22	0,22	0,05	21,7	0,12	0,35	0,22
<b>PSB</b>	560	1066	190,4	3	5889	143	518	2029	391,5	12	18271	64
<b>log PSB</b>	2,1243	0,8220	38,7	0,4771	3,7700	2,1535	2,0039	0,6348	31,7	1,0792	4,2618	1,8062
<b>VO</b>	4,56	0,35	7,7	3,83	5,76	4,53	4,21	0,37	8,8	2,73	5,38	4,22
<b>BMM</b>	-0,536	0,006	1,2	-0,550	-0,518	-0,535	-0,528	0,019	3,7	-0,552	-0,422	-0,532

*x* = aritmetický průměr; *SD* = směrodatná odchylka; *RSD* = variační koeficient (%); *Min* = minimum; *Max* = maximum; *LF<sub>HPLC</sub>* = obsah laktoferinu referenční metodou HPLC (mg/l); *LF<sub>MIR-FT</sub>* = obsah laktoferinu nepřímou metodou MIR-FT; *T* = obsah tuku (%); *B* = obsah hrubých bílkovin (%); *K* = obsah kaseinu (%); *L* = obsah monohydrátu laktózy (%); *TPS* = obsah tukuprosté sušiny (%); *TS* = obsah celkové sušiny (%); *M* = obsah močoviny (%); *VMK* = obsah volných mastných kyselin (mg/100 g tuku); *KC* = obsah kyseliny citronové (%); *PSB* = počet somatických buněk (tis./ml); *VO* = měrná vodivost (mS/cm); *BMM* = bod mrznutí mléka (°C)

Obr. 1 Zastoupení hodnot laktoferinu stanoveného referenční metodou HPLC v souboru A (mg/l)



Obr. 2 Zastoupení hodnot laktoferinu stanoveného referenční metodou HPLC v souboru B (mg/l)



### Validace původního kalibračního modelu pro stanovení laktoferinu nepřímou metodou MIR-FT (firemní kalibrace)

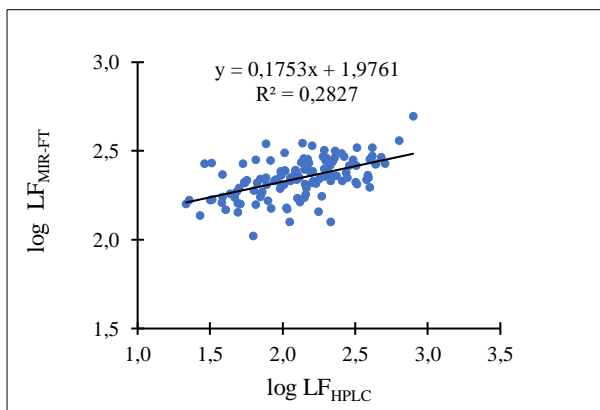
Provedení lineární regrese (Obr. 3a, b; Obr. 4 a, b) mezi hodnotami LF získanými referenční a nepřímou metodou ukázalo korelační koeficient (kalibrační korelační koeficient) 0,576 ( $P < 0,001$ ) pro soubor A a 0,286 ( $P < 0,01$ ) pro soubor B. Po logaritmické transformaci dat byly získány korelační koeficienty 0,532 ( $P < 0,001$ ) pro soubor A a 0,177 ( $P > 0,05$ ) pro soubor B.

Křížová validace poskytla korelační koeficient kalibrace (validační korelační koeficient; Tab. 2)  $0,575 \pm 0,034$  ( $P < 0,05$ ) pro soubor A a  $0,281 \pm 0,062$  ( $P > 0,05$ ) pro soubor B. Podobně, výsledky po logaritmické transformaci dat byly  $0,531 \pm 0,024$  ( $P < 0,05$ ) pro soubor A a  $0,178 \pm 0,051$  ( $P > 0,05$ ) pro soubor B. Výpočet křížové validace je uveden v příloze 1.

Diference průměrů mezi hodnotami LF získanými nepřímou a referenční metodou ( $LF_{\text{MIR-FT}} - LF_{\text{HPLC}}$ ; průměrná diference) a jejich směrodatné odchylky činily  $60,8 \text{ mg/l} \pm 110,8 \text{ mg/l}$  pro soubor A a  $119,9 \text{ mg/l} \pm 89,4 \text{ mg/l}$  pro soubor B (Tab. 3).

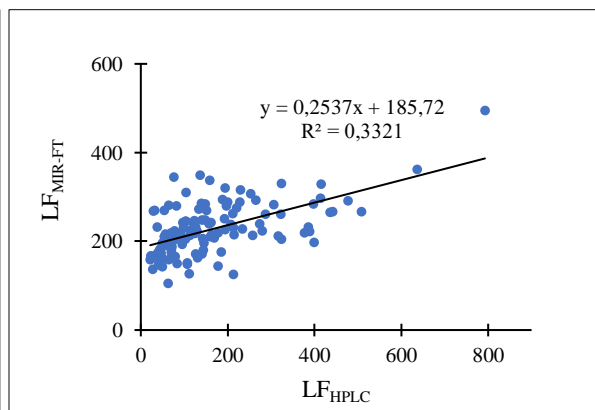
Provedená validace potvrdila použitelnost nepřímé metody MIR-FT pro analýzy LF v mléce k praktické kontrole zdravotního stavu mléčné žlázy krav, případně k predikci subklinické mastitidy při monitoringu zdraví zvířat. Je patrné, že lepší parametry validace vykázal soubor A, což lze přisuzovat vyššímu zastoupení vyšších hodnot LF v souvislosti se zvolenou metodikou odběru vzorků. Vliv obsahu sledované složky na kalibrační i validační koeficient determinace uvedli také Soyeurt et al. (2006).

Obr. 3a Regresní vztah mezi výsledky stanovení laktoferinu referenční (x, LF<sub>HPLC</sub>) a nepřímou metodou (y, LF<sub>MIR-FT</sub>) pro soubor A (n = 120)



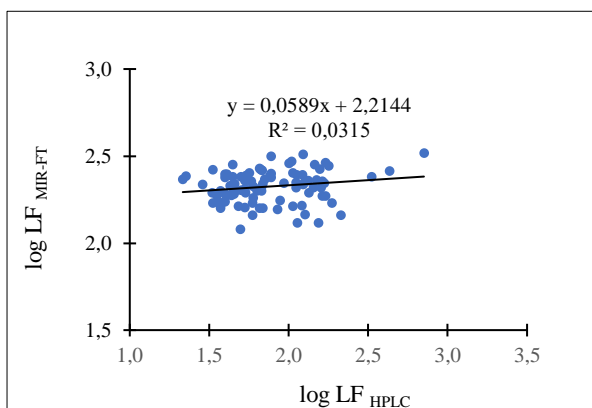
Korelační koeficient  $r = 0,576^{***}$

Obr. 3b Regresní vztah mezi výsledky stanovení laktoferinu referenční (x, LF<sub>HPLC</sub>) a nepřímou metodou (y, LF<sub>MIR-FT</sub>) pro soubor A (n = 120), po logaritmické transformaci



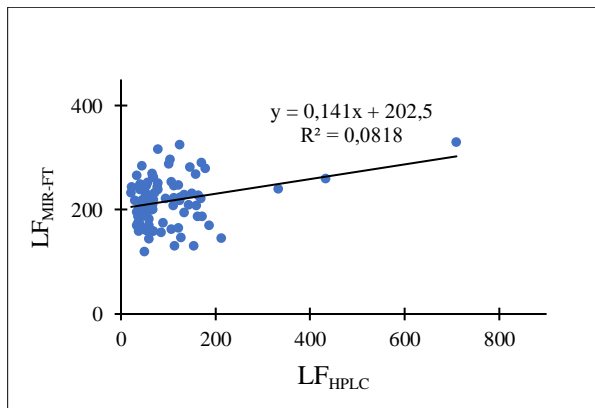
Korelační koeficient  $r = 0,532^{***}$

Obr. 4a Regresní vztah mezi výsledky stanovení laktoferinu referenční (x, LF<sub>HPLC</sub>) a nepřímou metodou (y, LF<sub>MIR-FT</sub>) pro soubor B (n = 91)



Korelační koeficient  $r = 0,286^{**}$

Obr. 4b Regresní vztah mezi výsledky stanovení laktoferinu referenční (x, LF<sub>HPLC</sub>) a nepřímou metodou (y, LF<sub>MIR-FT</sub>) pro soubor B (n = 91), po logaritmické transformaci



Korelační koeficient  $r = 0,177$  ns

Tab. 2 Výsledky kalibračního validačního koeficientu (aritmetický průměr ± směrodatná odchylka) pro hodnoty laktoferinu v původních hodnotách (A  $P < 0,05$ , B  $P > 0,05$ ) a v logaritmicky transformované podobě (A  $P < 0,05$ , B  $P > 0,05$ ) procedurou křížové validace.

Validace kalibrační korelace	Původní hodnoty	Transformované hodnoty (log)
Soubor A	$0,575 \pm 0,034$	$0,531 \pm 0,024$
Soubor B	$0,281 \pm 0,062$	$0,178 \pm 0,051$

Tab. 3 Diferenční analýza a párový *t*-test mezi výsledky stanovení laktoferinu referenční (IP RP HPLC) a nepřímou metodou (MIR-FT) pro soubor A a B

	Soubor A		Soubor B	
	Původní hodnoty (mg/l)	Transformované hodnoty (log)	Původní hodnoty (mg/l)	Transformované hodnoty (log)
<b>d</b>	60,8	0,2445	119,9	0,4461
<b>sd</b>	110,8	0,2931	89,4	0,2779

d = průměrná diference, rozdíl průměrů mezi hodnotami laktoferinu získanými nepřímou a referenční metodou;  
sd = směrodatná odchylka průměrné diference

### Význam laktoferinu jako ukazatele zdraví mléčné žlázy

Mastitida je doprovázena změnami ve složení mléka a zejména pro subklinickou formu mastitidy jsou tyto změny významné z hlediska její diagnostiky. V souvislosti se zdravím mléčné žlázy je v mléce sledován zejména PSB, případně také měrná vodivost, obsah laktosy a některé další parametry (Hamann a Zecconi 1998; Ogola et al. 2007; Antanaitis et al. 2021). Několik prací uvedlo také tendenci ke zvýšenému obsahu LF v mastidním mléce (Cheng et al. 2008; Hagiwara et al. 2023; Soyeurt et al. 2012). Pro zhodnocení významu stanovení LF z hlediska diagnostiky mastitid bylo v této metodice rovněž provedeno porovnání vztahů mezi vybranými mléčnými ukazateli (PSB, měrná vodivost, laktosa a měrná vodivost) a obsahem LF stanoveným referenční i nepřímou metodou. Korelační koeficienty mezi mléčnými ukazateli a LF v souborech A a B, doplněné o jejich významnost, uvádí Tab. 4.

LF<sub>HPLC</sub> koreloval s log PSB v souboru A ( $r = 0,578$ ;  $P < 0,001$ ) a B ( $r = 0,428$ ;  $P < 0,001$ ). Po logaritmické transformaci LF byly získány podobné korelace, v souboru A ( $r = 0,619$ ;  $P < 0,001$ ) a B ( $r = 0,418$ ;  $P < 0,01$ ) (Tab. 4). Cheng et al. (2008) zaznamenali pozitivní korelaci pouze LF a PSB skóre ( $r = 0,37$ ), nikoliv však LF a PSB. PSB je považován za zásadní diagnostický nástroj pro včasnou detekci subklinických i klinických mastitid, neboť je ovlivňován zejména právě probíhající infekcí a další faktory (např. laktace, věk dojnice, stres) mají většinou pouze malý vliv. Za hranici pro normální PSB je považována hodnota 200 tis./ml, při jejím překročení je pravděpodobné, že došlo k infekci mléčné žlázy (Harmon et al. 1994). Jak již bylo zmíněno, soubor A obsahoval značně vyšší podíl vzorků s PSB vyšším než 283 tis./ml než soubor B. Vzhledem k tomu, že k významnému zvýšení LF dochází právě při překročení této hranice (Cheng et al. 2008), lze tímto také vysvětlit silnější korelaci PSB a LF v souboru A.

LF<sub>HPLC</sub> a měrná vodivost ukázaly pozitivní korelaci v souboru A ( $r = 0,326$ ;  $P < 0,01$ ) i B ( $r = 0,476$ ;  $P < 0,01$ ), podobný vztah byl získán po logaritmické transformaci pro A ( $r = 0,359$ ;  $P < 0,01$ ) i B ( $r = 0,432$ ;  $P < 0,001$ ) (Tab. 4). Zvyšování měrné vodivosti mléka v důsledku mastitidy vysvětlují Hamann a Zecconi (1998) jako důsledek změn poměru kationtů a aniontů a laktosy, kdy v infikované čtvrti dochází k poklesu koncentrace laktosy a  $K^+$  a naopak nárůstu  $Cl^-$  a  $Na^+$ . LF<sub>HPLC</sub> negativně koreloval s obsahem laktosy v souboru A ( $r = -0,451$ ;  $P < 0,001$ ) i B ( $r = -0,308$ ;  $P < 0,01$ ) (Tab. 4). Po logaritmické transformaci byl podobný vztah zjištěn pro soubor A ( $r = -0,478$ ;  $P < 0,001$ ) a mírně horší pro soubor B ( $r = -0,186$ ;  $P > 0,05$ ). Podobných výsledků dosáhli Cheng et al. (2008) a Niero et al. (2023), kteří uvedli rovněž negativní korelaci LF a laktosy (Cheng  $r = -0,183$ ;  $P = 0,049$ ; Niero  $r = -0,33$ ;  $P < 0,001$ ). Uvedené zřejmě souvisí se skutečností, že zdraví mléčné žlázy je vedle metabolismu a energetické bilance významným

faktorem, který ovlivňuje schopnost mléčné žlázy syntetizovat laktosu. Uvedené je v souladu se tvrzeními Bobbo et al. (2017) a Antanaitis et al. (2021), kteří popsali tendenci ke snižování obsahu laktosy se zvyšujícím se PSB a nižší obsah laktosy v mléce s výskytem mastitidních patogenů než v mléce prostém mastitidních patogenů

Při stanovení LF metodou MIR-FT byla v souboru A zjištěná korelace s PSB ( $r = 0,290$ ;  $P < 0,01$ ), v souboru B pouze nevýznamný kladný korelační koeficient ( $0,108$ ;  $P > 0,05$ ) (Tab. 4). Podobnou pozitivní korelaci PSB a  $LF_{MIR-FT}$  ( $0,21$ ) uvedli rovněž Soyeurt et al. (2020). V souborech A ( $r = -0,265$ ;  $P < 0,01$ ) i B ( $r = -0,211$ ;  $P < 0,05$ ) poté  $LF_{MIR-FT}$  negativně koreloval s laktosou. Korelace získané po logaritmické transformaci hodnot  $LF_{MIR-FT}$  byly, stejně jako v případě hodnot  $LF_{HPC}$ , podobné jako vztahy původní.

Přestože byl vztah hodnot  $LF_{MIR-FT}$  k mléčným ukazatelům ve smyslu změn spojovaných s mastitidami většinou méně těsný ve srovnání se vztahy, které byly získány při stanovení LF referenční metodou HPLC, lze metodu MIR-FT považovat za vhodnou k doplňkové diagnostice mastitid.

Tab. 4 Vztah vybraných mléčných ukazatelů a obsahu LF stanoveného referenční (HPLC) a nepřímou metodou (MIR-FT) v souborech A ( $n = 120$ ) a B ( $n = 91$ )

		Soubor A		Soubor B	
		r	R <sup>2</sup>	r	R <sup>2</sup>
Laktosa	vs. $LF_{HPLC}$	-0,451 ***	0,203	-0,308 **	0,095
PSB		0,529 ***	0,280	0,387 **	0,150
log PSB		0,578 ***	0,334	0,428 **	0,183
Měrná vodivost		0,326 **	0,106	0,476 ***	0,226
Laktosa	vs. log $LF_{HPLC}$	-0,478 ***	0,228	-0,128 ns	0,017
PSB		0,463 ***	0,214	0,346 **	0,120
log PSB		0,619 ***	0,383	0,418 **	0,175
Měrná vodivost		0,359 **	0,129	0,432 ***	0,187
Laktosa	vs. $LF_{MIR-FT}$	-0,265 **	0,070	-0,211 *	0,044
PSB		0,290 **	0,084	0,108 ns	0,012
log PSB		0,326 **	0,106	0,159 ns	0,025
Měrná vodivost		-0,078 ns	0,006	-0,057 ns	0,003
Laktosa	vs. log $LF_{MIR-FT}$	-0,252 **	0,063	-0,186 ns	0,035
PSB		0,271 **	0,073	0,114 ns	0,013
log PSB		0,345 **	0,119	0,159 ns	0,025
Měrná vodivost		-0,094 ns	0,009	-0,101 ns	0,010

$r$  = korelační koeficient;  $R^2$  = koeficient determinace;  $LF_{HPLC}$  = obsah laktoferinu referenční metodou IP RP HPLC;

$LF_{MIR-FT}$  = obsah laktoferinu nepřímou metodou MIR-FT; PSB = počet somatických buněk;

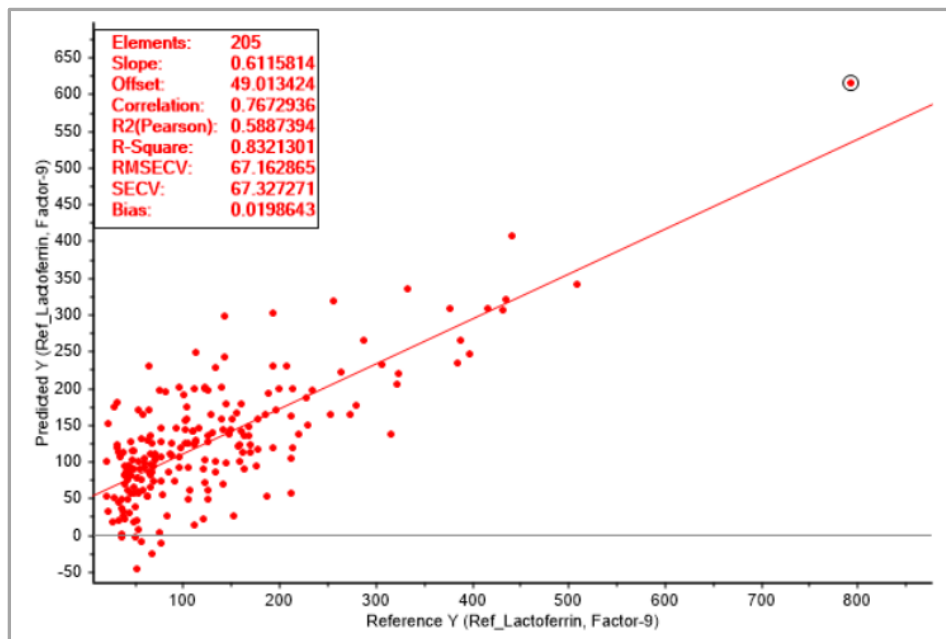
ns =  $P > 0,05$ ; \* =  $P \leq 0,05$ ; \*\* =  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $P \leq 0,001$

### Vývoj nového kalibračního modelu pro stanovení laktoferinu nepřímou metodou MIR-FT

S využitím referenčních hodnot LF získaných metodou HPLC byl vytvořen nový kalibrační model pro stanovení LF nepřímou metodou MIR-FT. Vztah referenčních a predikovaných hodnot v souboru C ( $n = 205$ ) poskytl korelační koeficient cross-validace 0,767, tj. korelační koeficient determinace cross-validace 0,589, a směrodatnou odchylku cross-validace 67,3 mg/l

(Obr. 5). Ve srovnání s prací Soyert et al. (2012), kteří uvedli korelační koeficient determinace cross-validace 0,71 a směrodatnou odchylku cross-validace 50,55 mg/l, se tak jedná jen o mírně horší výsledky. Také počet zahrnutých faktorů metodou PLS (Obr. 5), pro vysvětlení variability referenčních hodnot LF, byl poněkud vyšší (9) pro spolehlivost modelu. Ve srovnání s původním kalibračním modelem, kde pro soubor A byl vypočten validační korelační koeficient 0,575, byl u nového kalibračního modelu získán korelační koeficient cross-validace téměř o 0,2 vyšší. Je však nutné zohlednit, že v případě původního kalibračního modelu se jednalo o externí validaci.

Obr. 5 Korelační diagram obsahu laktoferinu získaného referenční metodou (IP RP HPLC) vs. predikovaných hodnot LF (mg/l) pro soubor C (n = 205)



### Závěr

Metodika předkládá postup validace kalibračního modelu pro rutinní stanovení LF nepřímou metodou MIR-FT a navrhuje vhodnou kalibrační/validační sadu vzorků mléka. Metodika dále popisuje možnost stanovení LF metodou MIR-FT s využitím nově vyvinutého kalibračního modelu.

Popsané stanovení LF nepřímou metodou MIR-FT má potenciál k využití v rámci kontroly užitečnosti k doplňkové diagnostice mastitid, případně určení výživové hodnoty mléka z hlediska obsahu LF a představuje tak vhodný postup k dalšímu zvyšování kvality syrového mléka.

## **Praktická doporučení v podmínkách mlékařství ČR na základě získaných výsledků:**

- stáda zvolená pro odběr vzorků kalibrační sady pro stanovení LF by měla reprezentovat průměrné podmínky chovu dojnic v ČR;
- odběr vzorků mléka pro tvorbu kalibrační sady by měl zahrnovat všechna roční období pro eliminaci vlivů jako je tepelný stres či rozdíly v krmení;
- plemena Holštýn a České strakaté by v kalibrační sadě měla být zastoupena přibližně v poměru 3 : 2 až 1 : 1;
- stáda dojnic, jejichž mléko bylo vybráno pro kalibrační sadu, by měla vykazovat dojivost za normovanou laktaci přibližně mezi 9 000 až 12 000 kg pro Holštýn a 5000 až 8000 kg pro České strakaté;
- pro zajištění dostatečného zastoupení vyšších hodnot LF v kalibrační sadě a tím potřebné variability hodnot LF je potřeba volit postup, kdy přibližně 2/3 vzorků mléka pochází od krav s PSB nad 300 tis./ml, lze předpokládat, že čím menší kalibrační soubor bude vytvořen, tím větší význam bude mít dodržení tohoto postupu.

Metodika představuje další rozšíření škály analýz mléka využívajících metodu MIR-FT v mlékařské praxi. Tím může přispět k rozšíření portfolia nabídky analytického servisu rutinních mléčných laboratoří v kontrole mléčné užitkovosti a kontrole kvality mléka pro chovatele dojnic. Nepřímo pak, možností praktického využití relevantních analytických výsledků (LF), otevírá možnosti pro zlepšování kontroly zdraví dojnic s ohledem na riziko výskytu poruch sekrece mléka a tím rovněž pro zlepšování kvality mléka jako potravinové suroviny.

## **Srovnání „novosti postupů” a předání metodiky**

- vyvinutá metodika bude předána pro užívání v systému kontroly kvality mléka a laboratorní práce (Svaz výrobců mléka a.s. Šumperk) v elektronické i písemné formě v prosinci 2024;
- jedná se o nový a validovaný postup rychlého stanovení minoritní složky mléka bílkoviny LF, které může být zařazeno do rutinně prováděné kontroly užitkovosti a být tak využito v diagnostice zdraví mléčné žlázy.
- metodika rozšiřuje škálu analýz mléka metodou MIR-FT pro analytický potenciál portfolia rutinních mléčných laboratoří v ČR;
- výsledky jsou jednak rozšířením dosavadních poznatků (použití metody HPLC jako referenční metody pro validaci stávajícího a vývoj nového kalibračního modelu, popis kalibrační sady vzorků pro stanovení LF, analýza vztahů obsahu LF stanoveného dvěma různými metodami k vybraným mléčným ukazatelům) a dále uvedením známých poznatků v nových souvislostech;
- žádný z uvedených postupů stanovení LF metodou MIR-FT nebyl v mléčných laboratořích v České republice dosud používán. V roce 2023 členové autorského kolektivu metodiky CM 46 pouze provedli pilotní hodnocení dodaného firemního kalibračního modelu pro stanovení LF (Bentley Instruments, Chaska, MN, USA), hodnocení je předmětem publikace Nejeschlebová et al. (2023). Popis stanovení LF metodou MIR-FT je nám dále znám pouze z prací kolektivu převážně belgických autorů (Soyert et al. 2007, 2012, 2020), kteří jako referenční metodu pro stanovení LF použili vždy metodu ELISA a přístroje FT6000 (Foss Analytical A/S, Hillerød, Dánsko).

## Popis uplatnění metodiky

Metodika bude poskytnuta Svazu výrobců mléka a.s., který představuje smluvního uživatele metodiky a disponuje potenciálem pro možnost vyjednávat rozšiřování rutinního spektra analýz mléka v praktických podmínkách.

Metodika bude na pracovišti Výzkumného ústavu mlékárenského s.r.o. v Praze.

Metodika bude přílohou zprávy za rok 2024 výzkumného projektu č. QK21010326 s názvem „Možnosti ovlivňování výskytu inhibičních látek v mléce jako účinný nástroj vedoucí k podpoře zdraví zvířat a ke zvyšování kvality a bezpečnosti potravin“

Pro širokou odbornou veřejnost bude metodika dostupná také z webových stránek <https://agronavigator.cz/metodiky/veterinari-lekarstvi>

## Ekonomické aspekty

Rutinní stanovení obsahu LF v mléce dojníc by mělo přispět k zpřesnění diagnostiky mastitid, tím pádem cílenější léčbě nemocných zvířat a dalšímu zvyšování kvality mléka. Dostupnost rychlé a levné metody stanovení LF může být rovněž využita pro deklaraci obsahu LF v mléce, což může představovat ztraktivnění této komodity pro spotřebitele. V souvislosti s podporou zdraví zvířat, kvality a hygieny mléka může ekonomický přínos činit podíl do 2 % v celém segmentu.

Přímé ekonomické možnosti:

- v případě existence analytického zařízení (modu) na lokalitě rutinní mléčné laboratoře může kvalifikovaným odhadem náklad na rozběh analytické činnosti činit u uživatele metody cca 150 tis. Kč;
- v případě promítnutí rozšíření servisu do ceny za vzorek v KU (vzrůst o 0,3 Kč na vzorek) může přímá tržba uživatele metodiky (chovatelská organizace) vzrůst o cca 900 tis. Kč ročně (250 tis. analýz měsíčně v KU v ČR, individuální vzorky mléka). Efekt je opakovatelný po rocích.

Nepřímý ekonomický přínos: lze velmi těžko kvantifikovat, proto výše uvedení 2% efektu z přínosu předpokládaného recovery v mléčné užitkovosti. Pokud by příspěvek LF diagnostiky a všech dalších preventivních opatření ke zlepšení mastitidní situace činil přínos znovunabytí mléka z předpokládané ztráty (během předchozího horšího stavu – dynamika zlepšení PSB) plošně v ČR 0,3 %, bylo by to 8 085 000 kg mléka (roční produkce ČR 2 695 000 000 kg, nákup mlékáren 2023), při ceně v ČR 11,44 Kč za kg (září 2024) je výsledná suma 92 492 400 Kč, z ní 2 % je 1 849 848 Kč ročně přínosu metodického postupu. Efekt je opakovatelný po rocích.

## Seznam použité literatury

- Antanaitis R, Juozaitienė V, Jonike V, Baumgartner W, Paulauskas A. Milk Lactose as a Biomarker of Subclinical Mastitis in Dairy Cows. *Animals*. 2021 Jun 10;11(6):1736.
- Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal Activity of Human Lactoferrin: Differentiation from the Stasis of Iron Deprivation. *Infect Immun*. 1982 Mar;35(3):792–9.
- Bobbo T, Ruegg PL, Stocco G, Fiore E, Gianesella M, Morgante M, Pasotto D, Bittante G, Cecchinato A. Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2017 Jun;100(6):4868–83.
- Bonfatti V, Degano L, Menegoz A, Carnier P. Short communication: Mid-infrared spectroscopy prediction of fine milk composition and technological properties in Italian Simmental. *J Dairy Sci*. 2016 Oct;99(10):8216–21.
- Bullen JJ, Rogers HJ, Leigh L. Iron-binding Proteins in Milk and Resistance to *Escherichia coli* Infection in Infants. *BMJ*. 1972 Jan 8;1(5792):69–75.
- EFSA. Scientific Opinion on bovine lactoferrin. *EFSA Journal*. 2012 May;10(5):2701.
- FDA. GRAS Notice (GRN) No. 669, Cow's milk-derived lactoferrin. 2016.
- Hagiwara S ichi, Kawai K, Anri A, Nagahata H. Lactoferrin Concentrations in Milk from Normal and Subclinical Mastitic Cows. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2003;65(3):319–23.
- Hamann J, Zeccconi A. Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator. In: *Bulletin of the International Dairy Federation* 334. Brussels; 1998. p. 5–22.
- Hanuš O, Hulová I, Genčurová V, Štolc L, Kučera J, Kopecký J, Jedelská R, Motyčka Z. Result interpretation of experimental calibration for milk citric acid determination via infra-red spectroscopy (MIR-FT). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2014 Oct 10;57(5):87–102.
- Harmon RJ. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. *J Dairy Sci*. 1994 Jul;77(7):2103–12.
- Ho PN, Luke TDW, Pryce JE. Validation of milk mid-infrared spectroscopy for predicting the metabolic status of lactating dairy cows in Australia. *J Dairy Sci*. 2021 Apr;104(4):4467–77.
- Chaneton L, Tirante L, Maito J, Chaves J, Bussmann LE. Relationship Between Milk Lactoferrin and Etiological Agent in the Mastitic Bovine Mammary Gland. *J Dairy Sci*. 2008 May;91(5):1865–73.
- Chen PW, Jheng TT, Shyu CL, Mao FC. Antimicrobial potential for the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with lactoferrin-resistant probiotics against foodborne pathogens. *J Dairy Sci*. 2013 Mar;96(3):1438–46.
- Chen PW, Liu ZS, Kuo TC, Hsieh MC, Li ZW. Prebiotic effects of bovine lactoferrin on specific probiotic bacteria. *BioMetals*. 2017 Apr 9;30(2):237–48.
- Cheng JB, Wang JQ, Bu DP, Liu GL, Zhang CG, Wei HY, Zhou LY, Wang JZ. Factors Affecting the Lactoferrin Concentration in Bovine Milk. *J Dairy Sci*. 2008 Mar;91(3):970–6.
- Khanal P, Tempelman RJ. The use of milk Fourier-transform mid-infrared spectroscopy to diagnose pregnancy and determine spectral regional associations with pregnancy in US dairy cows. *J Dairy Sci*. 2022 Apr;105(4):3209–21.
- McGrath BA, Fox PF, McSweeney PLH, Kelly AL. Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Sci Technol*. 2016 Mar 14;96(2):133–58.
- Nejeschlebová H, Hanuš O, Bartáková K, Samková E, Vorlová L, Navrátilová P, Borková M, Kučera J, Hasoňová L, Hálová K, Kopecký J. 2023. Některé vybrané analytické a interpretační aspekty obsahu laktoferinu v kravském mléce. *Mlékařské listy – zpravodaj*;34(1): 1–5.
- Niero G, Thomas SA, Mouratidou K, Visentin G, De Marchi M, Penasa M, Cassandro M. Lactoferrin concentration in bovine milk: validation of radial immunodiffusion technique, sources of variation, and association to udder health status. *Ital J Anim Sci*. 2023 Dec 31;22(1):230–8.
- Ogola H, Shitandi A, Nanua J. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *J Vet Sci*. 2007;8(3):237.
- Samková E, Hanuš O, Špička J, Pecová L, Bedrníček J, Kopunecz P, Klímová Z, Kopecký J. Routine Determination of Milk Fat Composition for Nutritional and Technological Purposes. *Acta Univ Agric Silv Mendel Brun*. 2019 Dec 22;67(6):1485–91.
- Soyeurt H, Bastin C, Colinet FG, Arnould VMR, Berry DP, Wall E, Dehareng F, Nguyen HN, Dardenne P, Schefers J, Vandenplas J, Weigel K, Coffey M, Théron L, Detilleux J, Reding E, Gengler N, McParland S.

- Mid-infrared prediction of lactoferrin content in bovine milk: potential indicator of mastitis. *Animal*. 2012;6(11):1830–8.
- Soyeurt H, Colinet FG, Arnould VMR, Dardenne P, Bertozzi C, Renaville R, Portetelle D, Gengler N. Genetic Variability of Lactoferrin Content Estimated by Mid-Infrared Spectrometry in Bovine Milk. *J Dairy Sci*. 2007 Sep;90(9):4443–50.
- Soyeurt H, Dardenne P, Dehareng F, Lognay G, Veselko D, Marlier M, Bertozzi C, Mayeres P, Gengler N. Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. *J Dairy Sci*. 2006 Sep;89(9):3690–5.
- Superti F. Lactoferrin from Bovine Milk: A Protective Companion for Life. *Nutrients*. 2020 Aug 24;12(9):2562.
- Tsakali E, Chatzilazarou A, Houhoula D, Koulouris S, Tsaknis J, Van Impe J. A rapid HPLC method for the determination of lactoferrin in milk of various species. *Journal of Dairy Research*. 2019 May 30;86(2):238–41.
- Valk-Weeber RL, Eshuis-de Ruyter T, Dijkhuizen L, van Leeuwen SS. Dynamic Temporal Variations in Bovine Lactoferrin Glycan Structures. *J Agric Food Chem*. 2020 Jan 15;68(2):549–60.
- van Knegsel ATM, van der Drift SGA, Horneman M, de Roos APW, Kemp B, Graat EAM. Short communication: Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2010 Jul;93(7):3065–9.
- Vanlierde A, Vanrobays ML, Gengler N, Dardenne P, Froidmont E, Soyeurt H, McParland S, Lewis E, Deighton MH, Mathot M, Dehareng F. Milk mid-infrared spectra enable prediction of lactation-stage-dependent methane emissions of dairy cattle within routine population-scale milk recording schemes. *Anim Prod Sci*. 2016;56(3):258.
- Yao Z, Zhang X, Nie P, Lv H, Yang Y, Zou W, Yang L. Identification of Milk Adulteration in Camel Milk Using FT-Mid-Infrared Spectroscopy and Machine Learning Models. *Foods*. 2023 Dec 18;12(24):4517.
- Zaalberg RM, Buitenhuis AJ, Sundekilde UK, Poulsen NA, Bovenhuis H. Genetic analysis of orotic acid predicted with Fourier transform infrared milk spectra. *J Dairy Sci*. 2020 Apr;103(4):3334–48.

## **Související normy**

- ČSN 57 0530 (570530). Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. Český normalizační institut, 1973.
- ČSN EN ISO 13366-1 (57 0531): Mléko - Stanovení počtu somatických buněk – Část 1: Mikroskopická metoda. Český normalizační institut. Praha, 2008.
- ČSN EN ISO 13366-2 (57 0531): Mléko - Stanovení počtu somatických buněk – Část 2: Návod pro ovládání fluoro-opto-elektronického přístroje. Český normalizační institut. Červenec 2007.
- ČSN EN ISO/IEC 17025. Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví: Praha, 2018
- ČSN ISO 8196-1 (570536). Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 1: Analytické atributy alternativních metod. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví: Praha, 2016.
- ČSN ISO 8196-1 (570536). Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 1: Analytické atributy alternativních metod. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví: Praha, 2016.
- ČSN ISO 8196-2 (570536). Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 2: Kalibrace a řízení kvality v laboratoři při analýzách mléka alternativními metodami. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví: Praha, 2016.
- ČSN ISO 8196-3 (570536). Mléko - Definice a hodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 3: Protokol pro hodnocení a validaci alternativních kvantitativních metod pro analýzu mléka. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví: Praha, 2016.

## Seznam publikací, které předcházely metodice

- Hanuš O, Genčurová V, Štolc L., Hulová I, Motyčka Z, Klimeš M, Jedelská R, Kopecký J. 2009. Zajištění kvality stanovení minoritních metabolicko-diagnostických složek mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT). Sborník přednášek, 2 THETA Analytical standards and equipment, Zajištění kvality analytických výsledků, Komorní Lhotka, 2009, 211-237.
- Hanuš O, Genčurová V, Zhang Y, Hering P, Kopecký J, Jedelská R., Dolínková A, Motyčka Z. 2011. Milk acetone determination by the photometrical method after microdiffusion and via FT infra-red spectroscopy. J Agrobiol;28(1):33-48.
- Hanuš O, Samková E, Říha J, Vyletěllová - Klimešová M, Roubal P. 2013. Evaluation of development in indirect determination of milk fat free fatty acids in Czech Republic. Acta Univ Agric Silvicae Mendel Brun;61(6):1669-1679.
- Nejeschlebová H, Hanuš O, Bartáková K, Samková E, Vorlová L, Navrátilová P, Borková M, Kučera J, Hasoňová L, Hálová K, Kopecký J. 2023. Některé vybrané analytické a interpretační aspekty obsahu laktoferinu v kravském mléce. Mlékařské listy – zpravodaj;34(1): 1–5.
- Samková E, Špička J, Hanuš O, Roubal P, Pecová L, Hasoňová L, Smetana P, Klimešová M, Čítek J. 2020. Comparison of fatty acid proportions determined by mid-infrared spectroscopy and gas chromatography in bulk and individual milk samples. Animals;10(6):1095.
- CERTIFIKOVANÁ METODIKA MSM 2678846201 CM 7 - název: Metodika validace a odhadu nejistoty výsledků měření u minoritních složek a vlastností mléka pro nepřímé metody MIR a MIR-FT v laboratořích kontroly užitkovosti a kvality mléka. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Agrovýzkumem Rapotín s.r.o. a ČMSCH a.s., Praha, z 13. 8. 2009. Datum certifikace 30. 9. 2009. Hanuš O, Jedelská R, Genčurová V, Vyletěllová M, Kopecký J, Sojková K.
- CERTIFIKOVANÁ METODIKA MSM 2678846201 CM 10 - název: Kalibrace metod MIR a MIR-FT v laboratořích kvality mléka za účelem měření koncentrace volných mastných kyselin (VMK) v mléčném tuku. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Agrovýzkumem Rapotín s.r.o. a ČMSCH a.s., Praha, z 10. 9. 2009. Datum certifikace 30. 9. 2009. Hanuš O, Hulová I, Genčurová V, Vyletěllová M, Kopecký J, Jedelská R.
- CERTIFIKOVANÁ METODIKA MSM 2678846201 MSM 2672286101 CM 18 - název: Příprava referenčních vzorků a posouzení kvality kalibrace pro stanovení ketonů jako acetonu metodou infračervené spektroskopie FT v mléčných laboratořích. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským, s.r.o. Praha a ČMSCH a.s., z 27. 9. 2011. Datum certifikace 13. 12. 2011. Hanuš O, Roubal P, Vyletěllová M, Elich O, Jedelská R, Höfer J.
- CERTIFIKOVANÁ METODIKA QJ1510336 RO1417 CM 35 – název: Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, Zemědělskou fakultou a Českomoravskou společností chovatelů a. s. z 27. 9. 2017. Datum certifikace 22. 12. 2017. Samková E, Hanuš O, Špička J, Klimešová M, Hasoňová L, Jedelská R, Trávníček J, Kopecký J, Kala R, Elich O.
- METODIKA CM 40 2023 – název: Postup nepřímého, rutinního, rychlého odhadu hodnoty titrační kyselosti mléka. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha a Czech Bentley s.r.o. z 14. 9. 2023. Datum certifikace 29. 9. 2023. Nejeschlebová H, Hanuš O, Klimešová M, Kopecký J, Jedelská R., Nejeschlebová L.

V Šumperku dne 01.11.2024

Za zhotovitele: Mgr. Hana Nejeschlebová

## **Příloha**

**Příloha 1 Výsledky výpočtu cross validace koeficientu kalibrace laktoferinu  
pro MIR-FT pro soubor A a B**

**Soubor A**

		<b>x, HPLC a y, MIR-FT</b>		<b>x, log HPLC a y, log MIR-FT</b>		
		<b>R<sup>2</sup></b>	<b>r</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>r</b>	
<b>A</b>	n = 120	0,3321	0,5760	n = 120	0,2827	0,5320
<b>B</b>	n = 110	0,3130	0,5590	n = 110	0,2490	0,4990
<b>C</b>	n = 110	0,3387	0,5820	n = 110	0,2977	0,5460
<b>D</b>	n = 110	0,3192	0,5650	n = 110	0,2800	0,5290
<b>E</b>	n = 110	0,3245	0,5700	n = 110	0,2682	0,5180
<b>F</b>	n = 110	0,3206	0,5660	n = 110	0,2645	0,5140
<b>G</b>	n = 110	0,3865	0,6220	n = 110	0,3046	0,5520
<b>H</b>	n = 110	0,3207	0,5660	n = 110	0,2704	0,5200
<b>I</b>	n = 110	0,3374	0,5810	n = 110	0,2952	0,5430
<b>J</b>	n = 110	0,2435	0,4930	n = 110	0,2539	0,5040
<b>K</b>	n = 110	0,4072	0,6380	n = 110	0,3548	0,5960
<b>L</b>	n = 110	0,3347	0,5790	n = 110	0,2697	0,5190
<b>M</b>	n = 110	0,3325	0,5770	n = 110	0,2791	0,5280
<b>A až M</b>	<b>n</b>	13	13	13	13	
	<b>x</b>	0,3316	0,5749	0,2823	0,5308	
	<b>sx</b>	0,0366	0,0323	0,0262	0,0241	
	<b>min</b>	0,2435	0,4930	0,2490	0,4990	
	<b>max</b>	0,4072	0,6380	0,3548	0,5960	
<b>B až M</b>	<b>n</b>	12	12	12	12	
	<b>x</b>	0,3315	0,5748	0,2823	0,5307	
	<b>sx</b>	0,0381	0,0336	0,0272	0,0250	
	<b>min</b>	0,2435	0,4930	0,2490	0,4990	
	<b>max</b>	0,4072	0,6380	0,3548	0,5960	
<b>B až L</b>	<b>n</b>	11	11	11	11	
	<b>x</b>	0,3315	0,5746	0,2825	0,5309	
	<b>sx</b>	0,0397	0,0351	0,0284	0,0261	
	<b>min</b>	0,2435	0,4930	0,2490	0,4990	
	<b>max</b>	0,4072	0,6380	0,3548	0,5960	

## Soubor B

x, HPLC a y, MIR-FT				x, log HPLC a y, log MIR-FT		
		R <sup>2</sup>	r		R <sup>2</sup>	r
<b>A</b>	n = 91	0,0818	0,2860	n = 91	0,0315	0,1770
<b>B</b>	n = 81	0,1013	0,3180	n = 81	0,0490	0,2210
<b>C</b>	n = 81	0,0891	0,2980	n = 81	0,0394	0,1980
<b>D</b>	n = 81	0,0893	0,2990	n = 81	0,0408	0,2020
<b>E</b>	n = 81	0,0970	0,3110	n = 81	0,0418	0,2040
<b>F</b>	n = 81	0,0125	0,1120	n = 81	0,0036	0,0600
<b>G</b>	n = 81	0,0826	0,2870	n = 81	0,0272	0,1650
<b>H</b>	n = 81	0,1145	0,3380	n = 81	0,0591	0,2430
<b>I</b>	n = 81	0,0836	0,2890	n = 81	0,0307	0,1750
<b>J</b>	n = 81	0,0779	0,2790	n = 81	0,0190	0,1380
<b>A až J</b>	<b>n</b>	10	10		10	10
	<b>x</b>	0,0830	0,2817		0,0342	0,1783
	<b>sx</b>	0,0257	0,0590		0,0148	0,0484
	<b>min</b>	0,0125	0,1120		0,0036	0,0600
	<b>max</b>	0,1145	0,3380		0,0591	0,2430
<b>B až J</b>	<b>n</b>	9	9		9	9
	<b>x</b>	0,0831	0,2812		0,0345	0,1784
	<b>sx</b>	0,0271	0,0622		0,0156	0,0510
	<b>min</b>	0,0125	0,1120		0,0036	0,0600
	<b>max</b>	0,1145	0,3380		0,0591	0,2430
<b>B až I</b>	<b>n</b>	8	8		8	8
	<b>x</b>	0,0837	0,2815		0,0365	0,1835
	<b>sx</b>	0,0286	0,0659		0,0155	0,0519
	<b>min</b>	0,0125	0,1120		0,0036	0,0600
	<b>max</b>	0,1145	0,3380		0,0591	0,2430