



**Práce vznikla za poskytnutí podpory na řešení koncepce rozvoje výzkumné organizace dle rozhodnutí MZe č. RO0311 a rozhodnutí MZe č. RO0511 ze dne 28.2.2011 o poskytnutí institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace.**

**Efektivní kalibrace techniky MIR-FT pro měření močoviny v mléčných laboratořích na bázi referenčních hodnot výkonnostních testů**

**Certifikovaná uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) k řešení referenčně-rutinních systémů analytických laboratoří testace kvality syrového mléka pro zvýšení věrohodnosti výsledků.**

#### **I) Cíl certifikované uplatněné metodiky:**

Cílem je rozšíření spektra vyšetřovacích metod a analytů a zajištění a zvýšení věrohodnosti výsledků a provozní jistoty managementu rutinních laboratoří při kontrole složení a kvality mléka pro účely kontroly užitkovosti (podpora šlechtění a zdravotního stavu zvířat) a proplácení mléka (zajištění kvality mléčného potravinového řetězce).

#### **Náplň certifikované uplatněné metodiky:**

Implementace dosažených výsledků, získaných na základě předchozího výzkumu a vývoje v rámci řešení projektů MŠMT MSM 2678846201, MSM 2672286101 a INGO LA 09030 a v rámci koordinační a konzultační metodické činnosti Národní referenční laboratoře pro syrové mléko (NRL-SM) Rapotín do prostředí laboratoří kontroly kvality mléka a mléčné užitkovosti dojnic provozovaných Českomoravskou společností chovatelů, a.s..

#### **Zdroj certifikované uplatněné metodiky:**

**projekty MŠMT MSM 2678846201, MSM 2672286101 a INGO LA 09030.**

**Zpracovali dne:** 21. 9. 2011; Oto Hanuš<sup>1, 2</sup>, Petr Roubal<sup>3</sup>, Václava Genčurová<sup>2</sup>, Ondřej Elich<sup>3</sup>, Jaroslav Kopecký<sup>2</sup>, Jiří Höfer<sup>3</sup>; <sup>1</sup> Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., Rapotín; <sup>2</sup> Agrovýzkum Rapotín, s.r.o.; <sup>3</sup> Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha; dále Akreditovaná Zkušební laboratoř č. 1340; Národní referenční laboratoř pro syrové mléko (NRL-SM) v síti ANSES; Referenční laboratoř pracovní síť referenčních mléčných laboratoří ICAR-CECALAIT a AMA-AFEMA.

**Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů metodiky od 1. 12. 2011.**



## **II) Vlastní popis certifikované metodiky** **Efektivní kalibrace techniky MIR-FT pro měření močoviny v mléčných laboratořích na bázi referenčních hodnot výkonnostních testů**

### **Struktura certifikované metodiky:**

- 1) Úvod
- 2) Cíl certifikované metodiky
- 3) Frekvence kalibrací
- 4) Postup ověření retrospektivní kalibrace
- 5) Praktické provedení metodiky
- 6) Závěr certifikované metodiky
- 7) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci certifikované metodiky
- 8) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky
- 9) Přílohové materiály s podklady pro vývoj certifikované metodiky

### **Hlavní použité zkratky:**

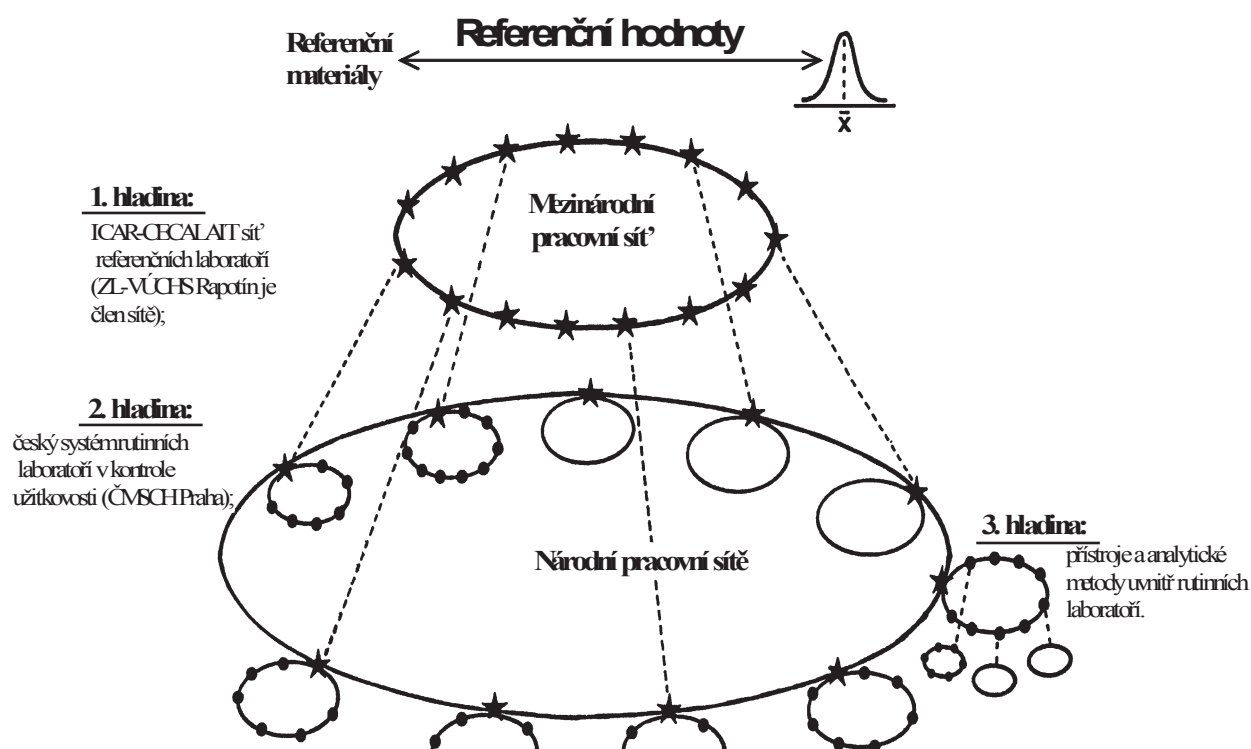
AFEMA = Pracovní skupina pro podporu zdraví vemene a hygieny mléka v alpských zemích;  
ANSES = Francouzská agentura bezpečnosti a hygieny potravin;  
ICAR = Mezinárodní výbor pro kontrolu užitkovosti zvířat;  
IDF = Mezinárodní mlékařská federace;  
LRM = laboratoř rozborů mléka;  
ČSN = Česká státní norma;  
MIR = tradiční filtrová technologie infraanalýzy mléka;  
MIR-FT = technologie infraanalýzy mléka s celým spektrem pomocí Michelsonova interferometru a s využitím Fourierových transformací;  
NRL-SM = Národní referenční laboratoř pro syrové mléko;  
PT = proficiency testing, výkonnostní testování analytické způsobilosti;  
RE = Euklidická vzdálenost od počátku;  
T = tuk;  
B = hrubé bílkoviny;  
L = monohydrát laktózy;  
STP = sušina tukuprostá;  
M = močovina;  
KMM = koncentrace močoviny v mléce;  
QA/QC = zajištění a řízení jakosti.

### **1) Úvod a současný stav**

#### ***Potřeba kontrolních mechanismů při mlékařské analytické práci***

Referenční a zejména rutinní výsledky přímých a hlavně nepřímých metod analýz mléka jsou používány v kontrole mléčné užitkovosti a hodnocení kvality mléka v praxi. Podle těchto výsledků se platí mléko nebo plemenný materiál (zvířata, inseminační dávky). Výsledky jsou tedy předmětem obchodu. Tím také často cílem zpochybnění z jedné nebo druhé strany, často nepodloženými doklady. Teoreticky je každý výsledek jako odhad chybný a příslušné nejistoty z validačního (akreditačního) procesu udávají obor spolehlivosti výsledků pro oficiální srovnání. Věrohodnost výsledků a minimalizace výsledkových neshod je průběžně zajišťována účastí laboratoří ve výkonnostním testování způsobilosti analytické práce v sítích referenčních a rutinních mléčných laboratoří podle známého schématu (Grappin, 1993, Obr. 1; Leray, 1993). V současnosti roste význam nepřímého, simultánního a sériového rutinního stanovení obsahu močoviny v mléce.

Obr. 1 Kontrola výsledků laboratoří hodnocením v pracovních sítích (Grappin, 1993) je nejspolehlivější způsob v mlékařství jak zlepšit a zajistit jejich věrohodnost. Je stěžejním motivem ICAR pracovní sítě referenčních mléčných laboratoří.



### **Referenční a kontrolní činnost pro referenční i rutinní mléčné laboratoře**

Referenční sady vzorků mléka pro kalibraci nepřímých metod kontroly základního složení mléka (obsahy tuku (T), hrubých bílkovin (B), laktózy (L), kaseinu (K), sušiny celkové (S), sušiny tukuprosté (STP)) v laboratořích Českomoravské společnosti chovatelů Praha poskytuje nyní pravidelně akreditovaná (podle ČSN EN ISO/IEC 17025) zkušební Národní referenční laboratoř pro syrové mléko (NRL-SM) Výzkumného ústavu pro chov skotu v Rapotíně podle vlastních metodik za použití oficiálně uznaných referenčních metod (ČSN 57 0530). V současnosti jsou propracovávány také metody pro určení referenčních hodnot stanovení močoviny v mléce pro kalibraci nepřímých metod MIR-FT. NRL-SM také aktivně

spolupracuje na souvisejících problémech v síti Národních referenčních laboratoří pro mléko a mléčné výrobky EU (ANSES, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) a jako člen kooperuje v pracovní síti referenčních mléčných laboratoří ICAR-CECALAIT (International Committee for Animal Recording - Centre d'Expertise et de Contrôle des Analyses Laitières) a Sterntestech AMA-AFEMA (Agrar Markt Austria - Arbeitsgruppe zur Förderung von Eutergesundheit und Milchhygiene in den Alpenländern, e.V.). Další vývoj a implementace kalibračních metod mlékařských analýz může přispět k provozní jistotě referenčních i nepřímých metod v referenčních i rutinních mléčných laboratořích.

### ***Význam minoritních složek v mléce***

Dobré zdraví hospodářských zvířat je pro podporu bezpečnosti potravinového řetězce stále důležitější. V mléce je řada složek, podle kterých lze metodou neinvazivního monitoringu kontrolovat zdravotní stav dojníc. Jedná se o majoritní složky: tuk; bílkoviny; laktóza; počet somatických buněk. Důležité jsou také složky minoritní, metabolity s úzkou vazbou na výživový stav dojníc: kyselina citrónová; močovina; volné mastné kyseliny; ketony. Z majoritních složek je nově významný kasein (kvůli možnosti rutinních analýz). Mléko, na rozdíl od krve nebo moče, zajišťuje snadný odběr vzorků, který je rutinně zvládnut, včetně chladového transportu do laboratoří. Kvalita analytických výsledků rozhoduje o správnosti jejich praktické interpretace. Důležité je vyhodnotit některé referenční a rutinní postupy (zejména MIR a MIR-FT, infračervená technologie (IR) s optickými filtry a IR celého spektra interferometrem s použitím Fourierových transformací) stanovení minoritních složek mléka z hlediska věrohodnosti analytických výsledků pro praktické použití.

### ***Význam měření močoviny v mléce***

Močovinu v mléce lze označit za minoritní složku, a pokud je obsažena ve zvýšené míře také za nežádoucí metabolit. Močovina (M) je konečný metabolit bílkovin v organismu a znalost hladiny vylučované močoviny je jedním z důležitých ukazatelů správnosti sestavení krmné dávky (Erbersdobler et al., 1980; Kirchgessner et al., 1986; Jonker et al., 1999; Hojman et al., 2004). Močovina je zpracovávána kromě jater také v ledvinách, jejichž prostřednictvím je močovina, po syntéze v játrech, do ledvin transportována a vylučována močí. Močovina je transportována z krve také do mléka. Koncentrace močoviny v organismu během dne kolísá, nejvyšších hodnot dosahuje 4 až 6 hodin po nakrmení, nejnižších hodnot před příjmem potravy (Gustafsson a Palmquist, 1993; Carlsson a Bergström, 1994). Za fyziologický obor se nejčastěji považuje rozsah od 18 do 35 mg.100ml<sup>-1</sup>. Mezi efekty, které koncentraci močoviny v mléce (KMM) ovlivňují, patří:

- příjem proteinu a energie (nadměrný obsah hrubého proteinu v krmné dávce zvyšuje obsah M v mléce a vyšší příjem energie KMM často snižuje);
- příjem proteinu degradovatelného a nedegradovatelného v bachoru;
- příjem vody a sušiny v krmné dávce (při dehydrataci organismu lze očekávat vyšší hladiny M);
- zdravotní stav, zvláště funkčnost jater a ledvin;
- některá onemocnění;
- pastva (vyšší obsah M na pastvě);
- doba odebrání vzorků mléka (ve smyslu intervalu mezi krmením a odběrem);
- fyziologické faktory laktace (Hanuš et al., 1993 a, b; Jílek et al., 2006; Řehák et al., 2009).

Koncentrace močoviny v mléce (KMM) je tedy respektovaným ukazatelem zdravotního a výživového stavu dojníc (Baker et al., 1995). Je ve vztahu k jejich reprodukci (Butler et al.,

1996), dlouhověkosti (Hanuš et al., 2000; Obr. 2, 3) a technologickým ukazatelům mléka (Kirst et al., 1985; Hanuš et al., 1993 a, c), které ve vyšší koncentraci pravidelně zhoršuje.

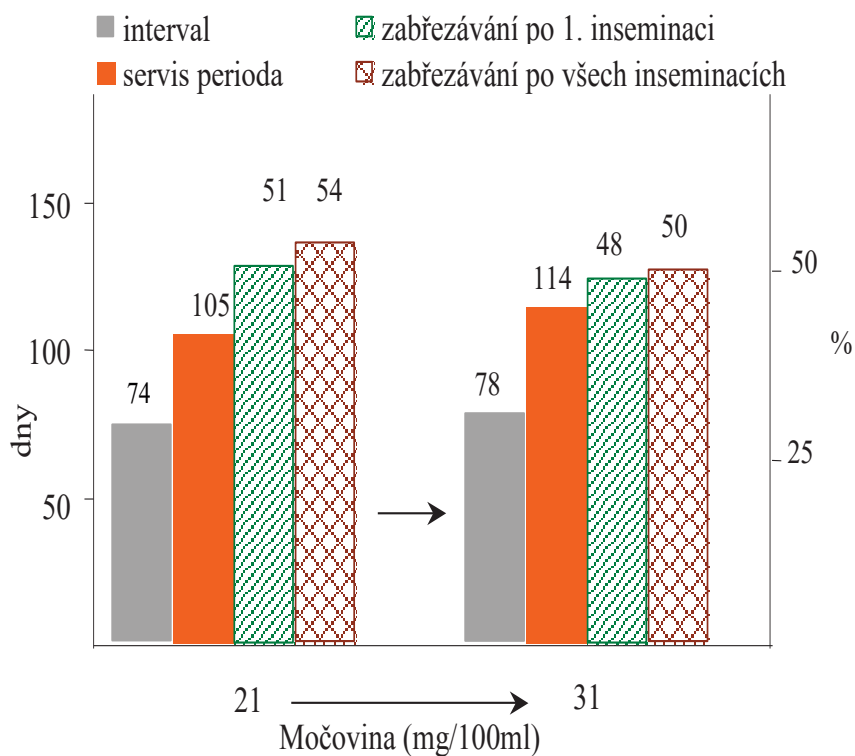
Existuje mnoho principů analýz KMM s různou věrohodností výsledků. V laboratorní praxi z těchto důvodů byla zaznamenána řada disproporcí. Proto jsou zdroje variability výsledků studovány. V ČR se provádí analýzy vzorků mléka na močovinu jednak ze vzorků určených pro kontrolu mléčné užitkovosti a dále ze vzorků bazénových, určených ke stanovení jakostních ukazatelů mléka. Výsledky využívají zootechnici, veterináři a poradci ve výživě.

Z používaných analytických metod připadají v úvahu metody přímé (Rajamäki a Rauramaa, 1984; Oltner et al., 1985), zejména specifické (ureolytické diferenční jako např. AFNOR (Lefier, 1999; Francie) Eurochem (Itálie), Chemspec (Broutin, 2000, 2006; Bentley Instruments, USA) nebo enzymaticko-konduktometrická metoda UREAKVANT (Ficnar, 1997; Hanuš et al., 1995, 1997, 2001; Klopčič et al., 1999; ČR) a nepřímé jako MIR (Herre, 1998) a zejména MIR-FT (Peterson et al., 2004).

Zatímco dřívější pojetí analýz v MIR technologii mělo značné problémy s věrohodností výsledků, řešení MIR-FT přineslo významné zlepšení věrohodnosti, např. vzrůstem specifity ve smyslu zlepšení recovery s ohledem na umělý přídavek močoviny. Existuje však více používaných metod vhodné úpravy hodnot v referenčních vzorcích pro potřeby kalibrace a kontroly metod MIR a MIR-FT při stanovení různých analytů v mléce

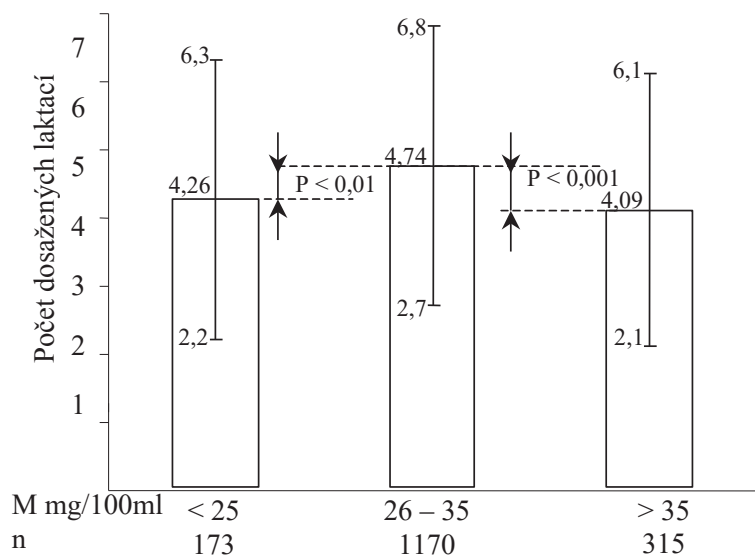
### ***Analytické možnosti určení koncentrace močoviny v mléce***

Měření KMM jako fyziologicko-zdravotního ukazatele lze provádět pomocí několika metod. MIR-FT technologie se jeví jako nadějná (Broutin, 2006; Roos et al., 2006) pro monitoring zdravotního stavu dojených samic přežvýkavců a usměrňování prevence jejich produkčních a reprodukčních poruch spojených s chybnou výživou a technologiemi v porovnání k jejich vysoké mléčné užitkovosti. Přesto jsou při určení mléčné urey upřednostňovány metody přímé, zejména specifické (ureolytické diferenční; Lefier, 1999; Broutin, 2000 a 2006), jako např. AFNOR (Francie) Eurochem (Itálie) nebo Chemspec (Bentley Instruments, USA). Takové je i stanovisko Mezinárodní mlékařské federace (IDF) ve smyslu probíhající selekce oficiální referenční metody (Lefier, 1999), kde specifická je základní podmínkou. Zde je nutné postupovat diferenční metodou, tzn. porovnat odezvu příslušné reakce před a po ureolýze nebo během ureolýzy a získané parametry, nejčastěji rozdíl, kalibrovat na známé KMM. Nejčastější diferenční měření jsou prováděna fotometricky (AFNOR, Chemspec), stanovením pH (Eurochem) nebo konduktometricky (Ureakvant, Česká republika; Hanuš et al., 1995, 1997, 2001, 2008; Ficnar, 1997; Klopčič et al., 1999; Hering et al., 2008). Byla popsána a vyhodnocena celá řada dalších specifických i nespecifických metod určení KMM na různých principech (Oltner a Sjaunja, 1982; Kirst et al., 1985; Oltner et al., 1985; Ficnar, 1997; Herre, 1998; Hanuš et al., 1997, 2001; Klopčič et al., 1999). Infračervená spektroskopie MIR-FT (celé IR spektrum s následnými Fourierovými transformacemi) je dnes využívanou moderní instrumentální (Foss Electric, Delta Instruments, Bentley Instruments) analytickou technologií v rutinních mléčných laboratořích pro kontrolu kvality mléka a kontrolu mléčné užitkovosti včetně kontroly výživy krav na bázi určení KMM. Naopak modifikace MIR jako filtrové technologie byla při určení KMM málo úspěšná, zejména s ohledem na recovery (Herre, 1998; Hanuš et al., 2001).



Obr. 2 Vztah vzrůstu dlouhodobé hladiny močoviny v bazénovém mléce k průměrným ukazatelům plodnosti stád dojnic (korelace uvedených vztahů = |0,15 až 0,22|;  $p < 0,01$ ; Říha a Hanuš a, b, 1999)

Obr. 3 Vliv dusíkatého zatížení metabolismu podle dlouhodobého obsahu močoviny (M) v mléce na délku produkčního věku krav.



### ***Příprava močovinných referenčních standardů***

Zcela zvláštním problémem je preparace mléčných močovinných standardů pro adekvátní kalibraci různých metod (např. MIR-FT; Foss, 1999, 2004 a, b). Tento byl a je rovněž podrobován experimentům a metodickému výzkumu, včetně vztahů metod považovaných za potenciálně referenční a dalších přímých a nepřímých (např. filtrová MIR technologie nebo MIR-FT), zhruba v následujících okruzích:

- příprava kalibračních standardů pro různé metody stanovení KMM, resp. jiných biologických tělních tekutinách (Wolfschoon-Pombo et al., 1981; Oltner a Sjaunja, 1982; Kirst et al., 1985; Oltner et al., 1985; Hanuš et al., 1995, 1997, 2008);
- výzkum, vývoj, konstrukce a validace enzymatických čidel, reaktorů, resp. biosensorů pro analýzy koncentrace močoviny v různých biologických materiálech, především v mléce (Thavarungkul et al., 1991; Sansubrinio a Mascini, 1994; Koncki et al., 1995; Ciana a Caputo, 1996; Sheppard et al., 1996; Ficnar, 1997; Jenkins et al., 1997, 1998; Hanuš et al., 1997, 2001);
- ověření vztahů nově vyvíjených principů a metod determinace KMM nebo krvi k metodám stávajícím, resp. potenciálně referenčním, zpravidla specifickým ureolytickým (Penca-Habjan a Golc-Teger, 1999; Broutin, 2000);
- upozornění na problematičnost výtěžnosti a věrohodnosti stanovení močoviny v podmínkách MIR filtrové transmisní infračervené technologie (Hanus et al., 2001) v porovnání k metodám validovaným, kdy koeficient determinace správnosti se pohyboval kolem 50 % (Herre, 1998).

## **2) Cíl certifikované metodiky**

Cílem této práce bylo vyvinout, validovat a implementovat efektivní, tzn. náklady snižující, ale svou věrohodností výsledků adekvátní, postup kalibrace moderních instrumentálních metod stanovení močoviny v mléce pro kontrolu zdravotního stavu dojnic MIR-FT na základě derivace referenčních hodnot z verifikovaného systému výkonnostního testování analytické způsobilosti (proficiency testing, PT; Obr. 1).

I) podpořit vlastní systém centrální kalibrace nepřímé mlékařské analytické techniky pro stanovení obsahu močoviny v mléce a aplikaci výkonnostních testů;

II) určit parametry referenčních hodnot vzorků syrového kravského mléka pro provedení močovinných kalibrací (MIR-FT);

III) určit statistické parametry kvality a akceptovatelnosti případně provedených retrospektivních močovinných kalibrací (MIR-FT).

### **3) Frekvence kalibrací**

Frekvence kalibrací metod MIR-FT pro určení močoviny v mléce není legislativně závazně upravena. Materiály výrobců instrumentů doporučují intervaly měsíční až tříměsíční, výsledky provedených kruhových testů naznačují, při funkčnosti techniky (mimo závažné opravy optického nebo homogenizačního systému), že interval tříměsíční by mohl být uspokojivý. Uvedené odpovídá také v ČR aplikované frekvenci výkonnostního testování měření koncentrace močoviny v mléce v referenčních i rutinních mléčných laboratořích.

### **4) Postup ověření retrospektivní kalibrace**

#### ***Laboratorní síť a použité metody analýz močoviny v mléce***

Národní referenční laboratoř pro syrové mléko (NRL-SM; akreditovaná podle ČSN EN ISO/IEC 17025; č. 1340, akreditační certifikát 040/2005) Rapotín provozuje národní výkonnostní testování (PT) pro určení koncentrace mléčné močoviny v rámci její referenční činnosti (v kooperaci pod hlavičkou ANSES, Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Aliments) od roku 2007. Sada kontrolních vzorků obsahuje 10 vzorů mléka, nativních i modifikovaných umělým přídavkem močoviny nebo ředěním původní koncentrace (Hering et al., 2008; Hanuš et al., 2008) destilovanou vodou. Test je prováděn každé tři měsíce s cca 10 účastníky (laboratoře výzkumné, centrální chovatelské, mlékárenské a veterinární v České republice, rovněž centrální na Slovensku). Zahrnuty jsou obvykle 4 metody (specifické ureolytické, fotometrické) analýz močoviny včetně MIR-FT. Výsledky PT jsou doručeny formou zprávy do každé laboratoře v období dvou týdnů po provedení PT – statisticky derivované referenční hodnoty PT a vyhodnocení PT systémem Euklidické vzdálenosti včetně posouzení přídavkové (M) recovery.

V NRL-SM byla použita pro stanovení KMM fotometrická metoda s Ehrlichovým činidlem a nepřímá metoda MIR-FT (Delta Instruments, Lactoscope FTIR, Holandsko). Ostatní pravidelní účastníci výkonnostních testů (OÚPT) metody podle seznamu a specifikace níže. Podrobnější popisy a charakteristiky použitých metod lze nalézt v předchozích pracích (Hanus et al., 1995, 1997, 2001, 2008, 2009 a 2011; Ficnar, 1997; Klopčič et al., 1999; Hering et al., 2008). Zde je naznačeno stručné metodické shrnutí:

- specifická metoda Ureakvant (UR) je založena na diferenčním měření změny elektrické konduktivity během ureolytické hydrolýzy močoviny ureázou a byla kalibrována na pětibodové škále mléčných močovinných standardů (OÚPT);
- fotometrická metoda BioLaTest (BI) je založena na změně barvy prostřednictvím reakce diacetylmonoximu měřené při 525 nm (Spekol 11, Carl Zeiss, Jena, Německo) a byla kalibrována na jeden standardní vodný vzorek (OÚPT, NRL-SM);

- fotometrická metoda s Ehrlichovým činidlem (EH) je založena na změně barvy reakce prostřednictvím paradimethylaminobenzaldehydu měřené při 420 nm (Spekol 11) a byla kalibrována na pětibodové škále standardních vodných vzorků (NRL-SM);
- spektroskopická metoda v infračervené oblasti spektra (MIR-FT) na zařízení Foss 6000 (Foss Electric, Dánsko; OÚPT) a Lactoscope FTIR (Delta Instruments, Holandsko; NRL-SM) byla kalibrována na desetibodové škále vzorků nativního mléka o různé KMM podle výsledků specifické referenční metody (UR; OÚPT), nebo nově odvozeným efektivním referenčním postupem (tato certifikovaná metodika) retrospektivně podle referenčních hodnot z PT (přijetí kalibrace cca 10 dní po PT v NRL-SM a kooperující centrální mléčné laboratoři ve Slovenské republice).

### ***Metody vyhodnocení výsledků***

Rutinní výkonnostní testy (PT) jsou vyhodnocovány systémem Euklidické vzdálenosti od počátku (Leray, 1993, 2006 a 2010; Hanuš et al., 1998). Výsledky kalibrace byly hodnoceny podle průměrné diference vůči referenčním hodnotám, směrodatnou odchylkou tohoto průměru individuálních diferencí ( $n = 10$  referenčních hodnot v sadě) popřípadě korelačním koeficientem (validační) vztahu referenčních a instrumentálních hodnot po přijetí kalibrace. Základními statistickými metodami a popisem byly z výsledků PT ( $n = 40$  za období desíti roků od února 2001 do února 2011) hodnoceny vybrané ukazatele. Podrobnější hodnocení, resp. validace retrospektivní kalibrace, bylo provedeno výběrově za období posledních tří roků a 14 PT, to je z periody aplikace nepřímé metody MIR-FT (Lactoscope FTIR, Delta Instruments) pro měření KMM v NRL-SM. Hodnoceny byly ukazatele jako průměrná odchylka od počátku (systematická chyba), její směrodatná odchylka diferencí metody od referenčních hodnot (náhodná chyba) a pořadí účastníka v PT podle Euklidické vzdálenosti.

### ***Celkový stav vývoje a stavu v PT u měření KMM***

Kalibrace nepřímých validovaných metod a účast v PT jsou nezbytné podmínky akreditačních auditů. Laboratoř může kalibrovat nepřímou metodu na KMM podle zakoupených referenčních standardů nebo podle výsledků své vlastní referenční metody (Ureakvant, Eurochem, Chemspec, metody fotometrické atp.) na vhodné sadě mléčných vzorků. Pro mléčnou močovinu je otázka referenčních metod stále předmětem profesní diskuse a případného budoucího řešení, resp. rozhodnutí (pro ICAR a IDF; LEFIER, 1999; BROUTIN, 2000 a 2006).

V rutinních mléčných laboratořích, často absentují referenční metody. To znamená nákup referenčních standardů a účast v PT nemalé náklady. Hledání cest k úsporám vede vývojově k myšlence praktické realizace retrospektivního principu efektivní kalibrace (RPEK) na základě odvození a kalibrační aplikace referenčních hodnot z výsledků PT. Softwarové (paměťové) vybavení moderních analyzátorů MIR-FT umožňuje takovou dodatečnou adjustaci po obdržení výsledků PT. Základním předpokladem je, že počet účastníků v PT (analytických odborníků, postupů, metod, přístrojů) zvyšuje pravděpodobnost věrohodnosti odvozovaných referenčních hodnot.

Bylo organizováno 40 PT pro stanovení KMM. Základní výsledková struktura vybraných PT je shrnuta v Tab. 1. Průměrná hodnota neúspěšnosti v PT činila 25,3 %. Tato hodnota je ovlivňována charakterem rozptylu hodnot výsledků v PT. V Tab. 2 je příklad výsledku PT (NRL-SM) pro KMM. Ten ukazuje variabilitu analytických výsledků, jejich diagnostické trendy k systematickým a náhodným chybám ( $d$  a  $sd$ ) a věrohodnost výsledků měření v praxi. Na Obr. 4 je výtěžnost umělého přídatku močoviny do mléka jednotlivými metodami. Recovery nepřesahuje a obvykle ani nedosahuje ideálních 100 % napříč metodami. Statistické

charakteristiky (průměr  $\bar{x}$  a směrodatná odchylka  $s_x$ ) hodnot  $d$  a  $sd$  souborů všech účastníků (I; Tab. 3) z PT a jen úspěšných účastníků (II; Tab. 4) ukazují srovnání jejich variability.

Tab. 1 Charakteristiky PT pro KMM.

Ukazatel	KMM
Počet PT	40
Počet účastníků celkem (opakovaně)	257
Průměrný počet účastníků v PT	7,45±0,37
Počet neúspěšných účastníků	65
Průměrný počet neúspěšných účastníků	1,85±0,08
% neúspěšných účastníků	25,3

Tab. 2 Výsledky PT stanovení koncentrace močoviny v mléce (KMM; difference mg/100ml) metodami ureolyticko-konduktometrickými, fotometrickými a MIR-FT.

u	d	sd	RE	t	význ.	
395	0,577	0,951	1,1121	1,92	ns	∩
399	0,402	1,174	1,2411	1,08	ns	∩
397	0,517	1,246	1,3493	1,31	ns	∩
3910	0,477	1,892	1,9514	0,80	ns	∩
398	1,277	1,515	1,9813	2,67	*	∩
391	-0,138	2,288	2,2925	0,19	ns	∩
396	-0,518	2,336	2,3923	0,70	ns	∩
394	-3,075	0,539	3,1216	18,03	***	N
392	3,201	1,111	3,3889	9,11	***	N
393	-3,319	1,730	3,7423	6,07	***	N
<b>D</b>	1,3501	1,4783				
<b>sD</b>	1,8327	0,5539				

→ diskriminační limit úspěšnosti

u = účastník (přístroj); d = průměrná difference LAB-REF (laboratoř – referenční hodnota); sd = směrodatná odchylka průměru individuálních rozdílů; RE = Euklidická vzdálenost od počátku; t = hodnota kritéria párového t-testu; význ. významnost rozdílu (ns =  $P > 0,05$ ; \* =  $P \leq 0,05$ ; \*\* =  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $P \leq 0,001$ ); N = nevyhověl; D = průměr d a sd; sD = směrodatná odchylka D pro d a sd.

Tab. 3 Charakteristiky (průměr  $\bar{x}$  a směrodatná odchylka  $s_x$ ) hodnot  $d$  a  $sd$  souborů všech účastníků (I) z PT pro KMM (mg/100ml).

Ukazatel		d	sd
KMM	n	257	257
	$\bar{x}$	-0,0793	1,3879
	$s_x$	3,0175	1,2237

n = počet účastníků všech PT; x = aritmetický průměr; sx = směrodatná odchylka; d = průměrná diference LAB-REF (laboratoř – referenční hodnota); sd = směrodatná odchylka průměru individuálních rozdílů.

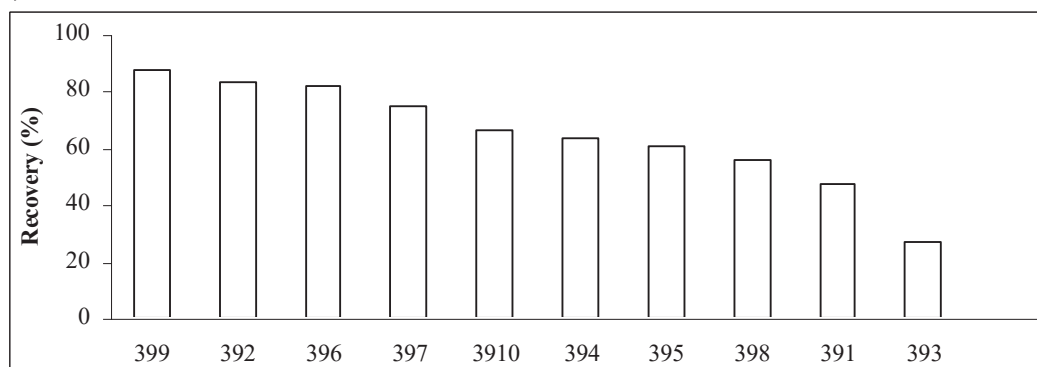
Tab. 4 Charakteristiky (průměr x a směrodatná odchylka sx) hodnot d a sd souborů jen úspěšných účastníků (II) vybraných z PT pro KMM (mg/100ml).

Ukazatel		d	sd
KMM	n	192	192
	x	-0,1654	1,1711
	sx	1,7140	0,4640

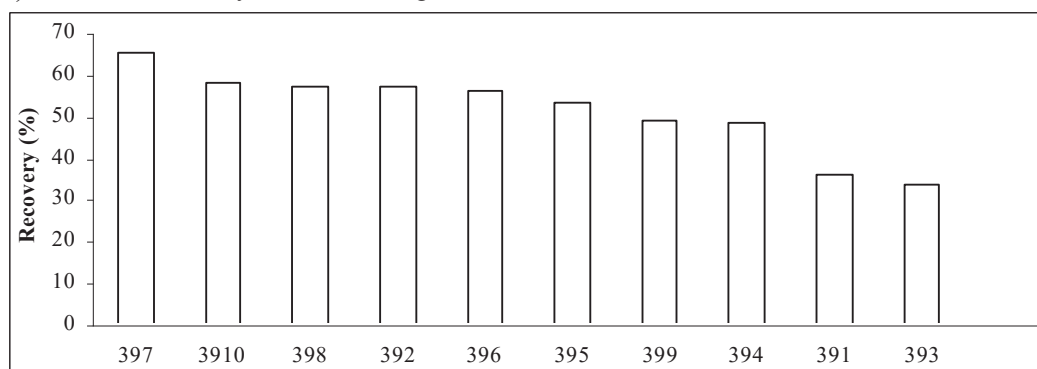
n = počet účastníků všech PT; x = aritmetický průměr; sx = směrodatná odchylka; d = průměrná diference LAB-REF (laboratoř – referenční hodnota); sd = směrodatná odchylka průměru individuálních rozdílů.

Obr. 4 Výtěžnost (recovery) umělého přídavku M do mléka s 0 jako původní KMM v PT metodami ureolyticko-konduktometrickými, fotometrickými a MIR-FT pro jednotlivé účastníky z NRL-SM.

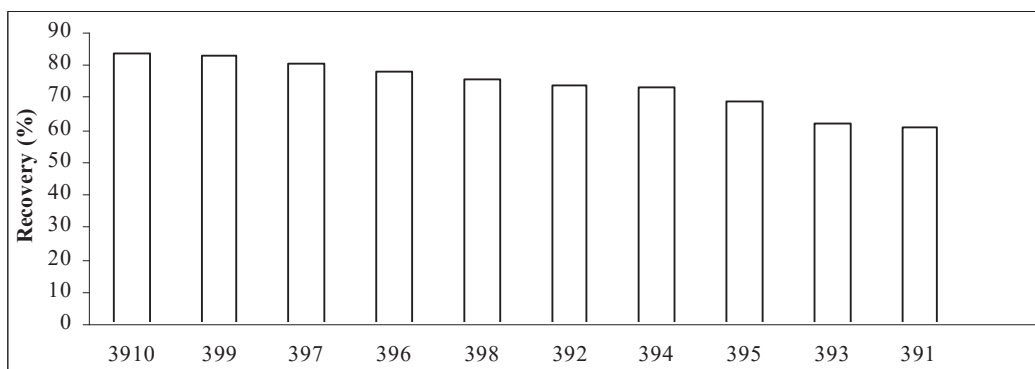
a) Přídavek močoviny do mléka 10 mg/100ml



b) Přídavek močoviny do mléka 20 mg/100ml



c) Přídavek močoviny do mléka 30 mg/100ml



### ***Použití retrospektivní kalibrace metody MIR-FT na měření KMM podle referenčních výsledků z PT***

Provedení retrospektivní kalibrace MIR-FT na měření KMM podle referenčních (REF) hodnot z PT přineslo kalibrační korelační koeficient z prvního měření i predikce odhadu od 0,952 ( $P < 0,001$ ) do 0,997 ( $P < 0,001$ ). Průměr činil  $0,984 \pm 0,011$  ( $n = 49$ ;  $P < 0,001$ ) MIR-FT k REF. Stejně hodnoty z prvního měření PT pro metodu EH činily od 0,932 ( $P < 0,001$ ) do 0,999 ( $P < 0,001$ ). Průměr byl  $0,991 \pm 0,018$  ( $n = 13$ ;  $P < 0,001$ ). Výsledky jsou srovnatelné. Srovnatelnost hodnot korelace přímé metody EH a MIR-FT umožňuje přijetí postupu retrospektivní kalibrace.

U opakované retrospektivní kalibrace byla průměrná odchylka od referenčních hodnot po přijaté kalibraci MIR-FT podle reference PT (predikční vyjádření) průměrně  $-0,039 \pm 0,224$  mg/100ml ( $n = 20$ ). Průměrná směrodatná odchylka tohoto průměrného rozdílu od referenčních hodnot činila  $1,833 \pm 0,690$  mg/100ml.

### ***Validace retrospektivního způsobu kalibrace nepřímé metody MIR-FT na měření KMM podle reference z PT***

Validace je provedena hodnocením jeho výsledků postupu v následném PT po cca 10 týdnech od přijetí kalibrace. V období, kdy byl opakovaně použit v NRL-SM retrospektivní způsob kalibrace KMM byla úspěšnost metody MIR-FT v PT (Tab. 5) 60,0 %. Průměrné pořadí v testu  $7,0 \pm 2,6$ . Průměrná odchylka od referenčních hodnot se pohybovala od -6,132 do 7,813 ( $n = 10$ ) s průměrem  $-0,296 \pm 3,088$  mg/100ml ( $n = 25$ ). Směrodatná odchylka průměrného rozdílu od referenčních hodnot v PT se pohybovala od 0,678 do 3,272 ( $n = 10$ ) s průměrem  $1,752 \pm 0,619$  mg/100ml ( $n = 25$ ). Srovnatelně korespondující ukazatele fotometrické metody (EH) v NRL-SM činily: úspěšnost v PT 64,3 %; průměrné pořadí v testu  $5,4 \pm 2,9$ ; průměrná odchylka od referenčních hodnot od -3,104 do 4,863 ( $n = 10$ ) s průměrem  $0,409 \pm 2,282$  mg/100ml ( $n = 14$ ); směrodatná odchylka průměrného rozdílu od referenčních hodnot od 0,529 do 7,847 ( $n = 10$ ) s průměrem  $1,234 \pm 1,006$  mg/100ml ( $n = 13$ ). Uvedené porovnání vykazuje srovnatelné hodnoty zvolených ukazatelů mezi metodami, i když

výsledky metody EH v PT byly lepší. Výsledky rovněž ukazují, že metoda MIR-FT se s ohledem na princip vyhodnocování PT mohla poměrně významně podílet na odvozování referenčních hodnot v PT. Přijetí retrospektivní kalibrace MIR-FT nijak nediskvalifikuje nepřímou metodu MIR-FT v pravděpodobnosti úspěš v PT v porovnání k běžně dosahovanému stavu u jiné metody.

Tab. 5 Validace metod MIR-FT po aplikaci retrospektivní kalibrace a EH při určení KMM (mg/100ml) v PT.

Metoda	% +	x Poř.	xd	xsd
MIR-FT	60,0	7,0 ± 2,6	-0,296 ± 3,088	1,752 ± 0,619
EH	64,3	5,4 ± 2,9	0,409 ± 2,282	1,234 ± 1,006

+ = úspěšnost v PT; x Poř. = průměrné pořadí v PT; xd = průměr průměrných rozdílů od referenčních hodnot; xsd = průměr směrodatných odchylek individuálních rozdílů od referenčních hodnot.

### ***Možnost aplikace výsledků v praxi***

Použité soubory poskytují podklady pro výpočty některých metodických limitů v příslušném PT a systému retrospektivní kalibrace. Umožňují 1,96 násobky  $s_x$  pro 95%ní interval spolehlivosti a model normální frekvenční distribuce pro některou z charakteristik PT nebo retrospektivní kalibrace (d, sd, r). To je významné při validaci a akreditaci uvedeného postupu PT a kalibrace v jednotlivých laboratořích systému laboratorní sítě.

Věrohodnost validovaných (statisticky očištěných) referenčních hodnot z PT, při významné účasti referenčních metod v PT, je vysoce pravděpodobně vyšší než při použití referenčních hodnot jedné referenční metody.

## **5) Praktické provedení metodiky**

### ***Příprava referenčních standardů***

Kontrolní sada vzorků obsahuje 10 reprezentativních vzorků vyváženě od obou hlavních dojených plemen skotu (holštýnské a české strakaté) v České republice s potřebnou škálou hodnot močoviny. Vzorky mléka v testu jsou upraveny z hlediska hledaného analytu do koncentrační škály vzájemnou kombinací nativních obsahů močoviny a také pomocí umělé manipulací (přidávky močoviny a ředění destilovanou vodou u vybraných vzorků mléka). Škála se pak pohybuje cca od 12 do 60 mg/100ml.

### ***Transport sad referenčních vzorků***

- Mléko je rozpipetováno, konzervováno čistým bronopolem (2-bróm, 2-nitro, 1, 3 propandiol; bílá barva, 0,03 %). Činidlo musí být šetrným mícháním rozpuštěno – mírné překlápění vzorkovnic.

- Vzorky se vychladí na 6 až 8 °C (cca 3 až 4 hodiny), vloží do termoboxu s chladicími vložkami a transportují šetrně při teplotě do 10 °C.

- Transport vzorků referenční sady musí být co nejšetrnější s ohledem na čas, teplotu a mechanické namáhání. Bylo dokázáno experimentálně, že praktikovaný systém transportu je použitelný (SOJKOVÁ et al., 2009).

- V laboratořích se vzorky zahřejí (max. 30 °C), rehomogenizují a duplicitně měří na obsah močoviny za podmínek metody.

### ***Referenční hodnoty***

- Referenční hodnoty PT pro jednotlivé vzorky se stanoví u organizátora PT (NRL-SM) jako aritmetické průměry vzorků z měření všech laboratoří po Grubbsově testu odlehlosti (0,05 %). Vypočtou se průměrné odchylky a variability odchylek laboratoří od referenčních hodnot a Euklidické vzdálenosti laboratoří od středu.

- V PT musí být zahrnuto více než polovina účastníků s metodami určení koncentrace močoviny v mléce, které vykazují referenční ambice a jen méně než polovina účastníků s nepřímou metodou.

### ***Předání výsledků na rutinní pracoviště***

Po výpočtu a validaci jsou referenční hodnoty PT pro jednotlivé vzorky deklarovány rozeslaným protokolem do rutinních laboratoří, elektronickou poštou ve formě oficiální tabulky. Je uvedena konvenční rozšířená kombinovaná nejistota výsledků měření referenční metody stanovená statisticky pro výsledky referenční metody v referenční centrální laboratoři.

### ***Vlastní kalibrace rutinních infraanalyzátorů***

- Vlastní kalibrace přístrojů MIR-FT na měření obsahu M v mléce na principu základního modelu lineární regresní analýzy signálů očištěných od interferenčních efektů při simultánní zpravidla multikomponentní analýze proběhne podle příslušných návodů výrobců zařízení, případně specifických standardních operačních postupů.

- Referenční hodnoty jsou do databáze přístroje vloženy se zpožděním (cca 10 dní) a je přijata kalibrace.

- Validační korelace mezi hodnotami referenčními a predikovanými by měla být vyšší než 0,94 a směrodatná odchylka průměrné difference by měla být nižší než 2,30 (1,1711 Tab. 4 krát 1,96 pro 95 % intervalu spolehlivosti) mg/100ml.

- Průměrná validační odchylka od referenční hodnoty je akceptovatelná do hodnoty 1,714 (Tab. 4) mg/100ml.

- Použití navržené metody také předpokládá pravidelnou kontrolu funkcí a vlastností přístroje (obecně opakovatelnost měření, stabilitu nastavení - pilotními vzorky, účinnost výplachu, přijatelnou chybu z přenosu atp.) a jejich pozitivní výsledky, zejména v období od účasti v PT do případného přijetí uvedené kalibrace.

- Uvedený retrospektivní princip kalibrace lze z důvodů respektování standardizace doporučit jen pro ukazatele metodicky nestandardizované (jako KMM) a nikoliv pro standardizované (tuk, bílkoviny, kasein, laktóza, sušina tukuprostá).

## **6) Závěr certifikované metodiky**

Popsaný postup a vyhodnocené výsledky doložené v přílohách, o které se postup v zásadě opírá, poskytují možnost technicky uplatnit nově ověřenou efektivní retrospektivní metodu kalibrace analýzy MIR-FT u důležité minoritní složky mléka, močoviny, na principu vyhodnocení výsledků výkonnostního testování pro možnost kontroly a zlepšení výživy zvířat a monitoringu zdravotního stavu, reprodukce a dlouhověkosti dojníc, obecně k podpoře provozní jistoty chovatelů.

### **III) Srovnání „novosti postupů“ a předání certifikované metodiky: Efektivní kalibrace techniky MIR-FT pro měření močoviny v mléčných laboratořích na bázi referenčních hodnot výkonnostních testů:**

- vyvinutá certifikovaná metodika byla předána do užívání systému laboratoří kontroly mléčné užitkovosti ČMSCH a. s. v elektronické i písemné formě 1. 12. 2011;
- jedná se o nový postup efektivní kalibrace pro měření a rozšíření spektra stanovovaných analytů v laboratořích kontroly kvality mléka a mléčné užitkovosti. Tato skutečnost je doložena přiloženými vlastními publikovanými výsledky. Uvedené postupy reference jsou v laboratořích používány krátce právě v souvislosti s vývojem metodiky a uvedené postupy kontroly měření nebyly doposud v konkrétních laboratořích používány.

### **IV) Popis uplatnění certifikované metodiky - Závěr - Kontrola uplatnění certifikované metodiky:**

- kontrola existence a aplikace certifikované uplatněné metodiky jako pracovního postupu pro efektivní retrospektivní kalibraci měření koncentrace močoviny metodou MIR-FT v mléčných laboratořích je proveditelná prostřednictvím revize dokladů a dokumentů o prováděných pracovních postupech a výsledcích při kalibracích a kontrole infraanalyzátorů v Laboratoři rozborů mléka v Buštěhradu a v Brně-Tuřanech a v laboratoři Examinála v Žilině, tedy na pracovišti klienta, především ČMSCH a.s.;

- certifikovaná uplatněná metodika obsahuje technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) k řešení referenčně-rutinních systémů analytických laboratoří k testaci kvality syrového mléka;

- certifikovaná uplatněná metodika byla zpracována v šesti exemplářích a předána v kroužkové vazbě na příslušná pracoviště.

### **V) Ekonomické aspekty**

Ekonomický dopad je součástí kontroly zdravotního (výživy, reprodukce a dlouhověkosti) stavu dojníc a kvality mléka, prevenční práce s ohledem na rizika v chovu dojeného skotu a poradenství ke kvalitě mléka. Zlepšením kvality výsledků zde může tvořit podíl do 15 % efektu ve smyslu zajištění zlepšeného zdravotního stavu krav, tedy redukce běžných ztrát způsobených nedostatkem informací, které mohou tvořit podle odhadů značné obchodní ztráty. Objem případných ztrát je ovšem obtížné vyčíslit konkrétněji neboť závisí na objemu produkce farmářů. Na úrovni ČR se pak může jednat o částky v řádu milionů.

Náklady na konkrétní zavedení postupu uvedeného v metodice mohou pro uživatele (mléčnou laboratoř) činit podle kvalifikovaného odhadu v laboratořích v ČR celkem 1 tis. Kč (poplatky za provedení výkonnostních testů) ročně. Činnost se periodicky aktualizuje, ročně činí její zavedení 4 tis. Kč. Přínos pro uživatele (laboratoře) v podobě tržeb za provedené rutinní analýzy (odhad 4 000 analýz individuálních vzorků měsíčně krát 12 činí 48 000 analýz krát 10 Kč za analýzu je 480 000 Kč ročně. Efekt je opakovatelný po rocích.

## VI) Seznam použité související literatury

### 7) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky

- Baker, L. D.- Fergusson, J. D.- Chalupa, W.: Response in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 78, 1995, 2424-2434.
- Broutin, P. J.: Evaluation of an enzymatic method for the rapid and specific determination of urea in raw milk. *Proceeding of 32nd ICAR Session, Bled, Slovenia, 2000.*
- Broutin, P. J.: Use of highly accurate enzymatic method to evaluate the relationship between milk urea nitrogen and milk composition and yield on bulk and individual milk samples. *35th ICAR Session, Kuopio, Finland, 2006.*
- Butler, W. R.- Calaman, J. J.- Beam, S. W.: Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci.*, 74, 1996, 858-865.
- Carlsson, J., Bergström, J.: The diurnal variation of urea in cow's milk and how milk fat content, storage and preservation affects analysis by a flow injection technique. *Acta vet. scand.*, 35, 1994: 67-77.
- Ciana, L. D.- Caputo, G.: Robust, reliable biosensor for continuous monitoring of urea during dialysis. *Clinical Chemistry*, 47, 7, 1996, 1079-1085.
- Erbersdobler, H. F., Eckart, K., Zucker, H., 1980: Milk urea levels as a measure of imbalances in energy and protein intake. *Pro. IV th Int. Conf. on Production Disease in Farm Animals, München, Germany, 4.*
- Ficnar, J.: The analytical parameters of the automatic analyzer „Ureakvant“ evaluating the urea content in a cow's milk. (In Czech) *Validation of the method. RICB Rapotín, 1997.*
- Foss: MilkoScan FT 120; Improved milk calibration. *Foss Analytical Application Note No. 128e, November 2004 a, P/N 580282, 1-14.*
- Foss: MilkoScan FT 120; Urea calibration: Determination of urea in raw cow's milk. *Foss Analytical Application Note No. 95a, December 2004 b, P/N 492280, 1-6.*
- Foss: MilkoScan FT 6000; Urea measurement, Issue 76100-30bGB, November 1999, 1-5.
- Grappin, R., 1993: European network of dairy laboratories. V: *Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories. Sonthofen / Germany, 1992-05-18/20, Brussels, 205-211.*
- Gustafsson, A. H., Palmquist, D. L.: Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. *J. Dairy Sci.*, 76, 1993: 475-484.
- Herre, A.: Den Harnstoff-Werten nicht blind vertrauen! *Top Agrar*, 2, 1998, R10.
- Hojman, D.- Kroll, O.- Adin, G.- Gips, M.- Hanochi, B.- Ezra, E.: Relationships between milk urea and production, nutrition and fertility traits in Israeli dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 87, 2004, 1001-1011.
- Jenkins, D. M.-, Delwiche, M. J.- BonDurant, R. H.: Automated biosensor for measurement of milk-urea. *Presentation at the 1998 ASAE Annual International Meeting. 1998, 1-10.*
- Jenkins, D. M.- Delwiche, M. J.- DePeters, E. J.- BonDurant, R. H.: Chemical assay of urea

- for automated sensing in milk. Work, unpublished results. 1997, 1-20.
- Jílek, F.- Řehák, D.- Volek, J.- Štípková, M.- Němcová, E.- Fiedlerová, M.- Rajmon, R.- Švestková, D.: Effect of herd, parity, stage of lactation and milk yield on urea concentration in milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 51, 12, 2006, 510-517.
- Jonker, J. S.- Kohn, R. A.- Erdman, R. A.: Milk urea nitrogen target concentrations for lactating dairy cows fed according to national research council recommendations. *J. Dairy Sci.*, 82, 1999, 1261-1273.
- Kirchgessner, M., Kreuzer, M., Roth Maier Dora, A., 1986: Milk urea and protein content to diagnose energy and protein malnutrition of dairy cows. *Arch. Anim. Nutr.*, 36, 192-197.
- Kirst, E.- Lill, R.- Cersovsky, H.- Bartel, B.- Jacobi, U.- Lemke, B.- Krenkel, K.: Einfluss einer Energiemangelernährung laktierender Rinder auf Zusammensetzung und Eigenschaften der Rohmilch. *Milchforsch. Milchpraxis*, 27, 1985, 84-86.
- Klopčič, M.- Pogačar, J.- Hanuš, O.: Comparison of urea content in milk, measured in different laboratories. *Acta Agraria Kaposváriensis*, 3, 2, 1999, 71-77.
- Koncki, R.- Mohr, G. J.- Wolfbeis, O. S.: Enzyme biosensor for urea based on a novel pH bulk optode membrane. *Biosensors and Bioelectronics*, 10, 1995, 653-659.
- Lefier, D.: Comparison of the analytical characteristics of the enzymatic methods for urea determination in milk. 1998. IDF Questionnaire-Report, 1999. Urea determination - selection of a reference method for the determination of the urea content of milk. 2009/E, 1998.
- Leray, O.: CECALAIT: an organization to support analytical quality assurance in dairy laboratories. *Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories*. Sonthofen / Germany, 1992 – 05 – 18/20, Brussels, 1993, 349-360.
- Leray, O.: Reference and calibration system for routine milk testing – advantages / disadvantages, choice criteria. 3rd ICAR reference laboratory network meeting – Kuopio, Finland – 6th June, 49-65. *Breeding, production recording, health and the evaluation of farm animals*. EAAP publication No. 121, 2007, *Proceedings of the 35th biennial session of ICAR*, ISBN: 978-90-8686-030-2, 2006, 311-317.
- Leray, O.: Analytical precision performance in ICAR proficiency testing programmes. ICAR 37th Annual Meeting, Riga, Latvia, 31 May – 4 June, 2010.
- Oltner, R.- Bengtsson, S.- Larson, K.: Flow injection analysis for the determination of urea in cows milk. *Acta vet. scand.*, 26, 1985, 396-404.
- Oltner, R.- Sjaunja, L. O.: Evaluation of rapid method for the determination of urea in cow's milk. *Acta veter. scand.*, 23, 1982, 39-45.
- Oltner, R., Bengtsson, S., Larson, K.: Flow injection analysis for the determination of urea in cows milk. *Acta vet. scand.*, 26, 1985, 396-404.
- Penca-Habjan, V.- Golc-Teger, S.: Determination of milk urea content in relation to freezing point of milk. 2. Slovenian Congress „Milk and Dairy Products” Portorož, PB-16, 1999, 61.
- Peterson, A. B.- French, K. R.- Russek-Cohen, E.- Kohn, R. A.: Comparison of analytical methods and the influence of milk components on milk urea nitrogen recovery. *J. Dairy Sci.*, 87, 2004, 1747-1750.
- Rajamäki, S., Rauramaa, A.: The automated determination of urea in milk. *Finn. Chem. Lett.*, 1984: 47-8.
- Roos de, A. P. W.- Bijgaart van den, H. J. C. M.- Horlyk, J.- Jong de, G.: Screening for subclinical ketosis in dairy cattle by Fourier transform infrared spectrometry. *Technical presentations, 35th ICAR Session, Kuopio, Finland, 10th June 2006*, 53-59.
- Řehák, D.- Rajmon, R.- Kubešová, M.- Štípková, M.- Volek, J.- Jílek, F.: Relationships between milk urea and production and fertility traits in Holstein dairy herds in the Czech Republic. *Czech J. Anim. Sci.* 54, 5, 2009, 193-200.

- Říha, J.- Hanuš, O.: Vztahy mezi ukazateli plodnosti stád krav a metabolickými a složkovými ukazateli v bazénových vzorcích mléka. Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, 2, 1999 a, 1-6.
- Říha, J.- Hanuš, O.: Vztahy mezi individuálními ukazateli reprodukce a složením mléka krav v prvních 120 dnech laktace. Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, 1999 b, 4, 3-17.
- Sansubrina, A.- Mascini, M.: Development of an optical fibre sensor of ammonia, urea, urease and IgG. Biosensors and Bioelectronics, 9, 1994, 207-216.
- Sheppard, N. F.- Mears, D. J.- Guiseppi-Elie, A.: Model of an immobilized enzyme conductimetric urea biosensor. Biosensors and Bioelectronics, 11, 10, 1996, 967-979.
- Thavarungkul, P.- Håkanson, H.- Holst, O.- Matiasson, B.: Continuous monitoring of urea in blood during dialysis. Biosensors and Bioelectronics, 1991, 101-107.
- Wolfschoon-Pombo, A.- Klostermeyer, H.- Buchberger, J.- Graml, R.: Harnstoff in der NPN-Fraktion der Kuhmilch – Bestimmung, Vorkommen und Beeinflussung. Milchwissenschaft, 36, 1981, 426-466.

## VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

### 8) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci certifikované metodiky

- Hanuš, O.- Beber, K.- Ficnar, J.- Genčurová, V.- Gabriel, B.- Beranová, A.: Relationship between the fermentation of bulk milk sample, its composition and contents of some metabolites. (In Czech) Živoč. Výr. / Czech J. Anim. Sci., 38, 7, 1993 a, 635-644.
- Hanuš, O., Benda, P., Jedelská, R., Kopecký, J.: Design a vyhodnocení prvního celostátního testu kvality rutinních analýz základního složení mléka. Design and evaluation of the first national qualitative testing of routine milk analyses. (In Czech) Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. (Brno), ISSN 1211-8516, XLVI, 3, 1998, 33-53.
- Hanuš, O., Ficnar, J., Jedelská, R., Kopecký, J., Beranová, A., Gabriel, B.: Metodické problémy stanovení dusíkatých látek v kravském mléce. Methodical problems of nitrogen matters determination in cow's milk. (In Czech) Vet. Med. – Czech., 40, 12, 1995, 387-396.
- Hanuš, O.- Ficnar, J.- Kopecký, J.- Jedelská, R.- Beranová, A.- Havlíčková, K.: Retrospektivní studie výsledků a vývoje designu metodiky pro přípravu sad močovinových mléčných kalibračních standardů. Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, 2, 1997, 7-21.
- Hanuš, O., Frelich, J., Janů, L., Macek, A., Zajíčková, I., Genčurová, V., Jedelská, R.: Impact of different milk yields of cows on milk quality in Bohemian spotted cattle. Acta Vet. Brno, 76, 4, 2007, 563-571.
- Hanuš, O.- Genčurová, V.- Ficnar, J.- Gabriel, B.- Žváčková, I.: Vztah obsahu močoviny a bílkovin v stádových vzorcích mléka k některým chovatelským faktorům. The relationship of urea and protein in bulk milk to some breeding factors. Živočišná Výroba, 1993 b, 38, 1, 61-72.
- Hanuš, O., Genčurová, V., Janů, L., Macek, A., Klimeš, M., Hering, P., Zajíčková, I., Kopecký, J., Jedelská, R., Dolínková, A.: Komparativní studie vývoje a stavu systémů zajištění analytické kvality pro laboratoře při kontrole základního složení syrového kravského mléka v ČR. Comparative study of development and state of analytical quality assurance systems of laboratories at raw milk composition monitoring in the Czech Republic. Výzkum v chovu skotu, XLVII, 170, 2, 2005, 8-18.
- Hanuš, O.- Genčurová, V.- Jedelská, R.- Štolc, L.- Klímová, Z.- Motyčka, Z.- Kopecký, J.: Validace a nejistoty měření koncentrace močoviny a bodu mrznutí mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR-FT) pro laboratoře kvality mléka. Validation and uncertainties of urea concentration and milk freezing point measurement via infrared

- spectroscopy (MIR-FT) for laboratories of milk quality. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 186, 2, ISSN 0139-7265, 2009, 40-53.
- Hanuš, O., Genčurová, V., Kopec, T., Yong, T., Janů, L.: Validation of modified milk reference sample in terms of its suitability for infra-red analysis calibration via evaluation of physical properties. Ověření modifikovaného referenčního vzorku mléka ve smyslu jeho vhodnosti pro kalibraci infračervené analýzy pomocí hodnocení fyzikálních vlastností. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, ISSN 1211-8516, LVIII, 2, 2010, 101–110.
- Hanuš, O., Genčurová, V., Ponížil, A., Hlásný, K., Gabriel, B., Míčová, Z.: The effects of year season, urea, acetone and nitrate additions and native content of microelements on cow's milk fermentation. (In Czech) *Živočišná Výroba*, 38, 8, 1993 c, 753-762.
- Hanuš, O., Genčurová, V., Říha, J., Vyletělová, M., Jedelská, R., Kopecký, J., Dolínková, A.: Specifika referenčních materiálů a výkonnostního testování způsobilosti výsledků u základních mlékařských analýz. Specificity of reference materials and results proficiency testing in basic milk analyses. (In Czech) In proceedings: Referenční materiály a mezilaboratorní porovnávání zkoušek III. Reference materials and interlaboratory investigation comparison III. Mezinárodní konference, 2 THETA Analytical standards and equipment, Medlov, ISBN: 978-80-86380-46-9, 2008, 53-78.
- Hanuš, O., Genčurová, V., Štolc, L., Kučera, J., Sojková, K., Jedelská, R., Kopecký, J., Dolínková, A.: Srovnání a vyhodnocení parametrů kalibrací metody infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT) podle výsledků referenčních metod pro složení kravského, kozího a ovčího mléka. A comparison and evaluation of calibration parameters of infrared spectroscopy method (MIR and MIR-FT) according to results of reference methods for cow, goat and sheep milk composition. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 187, 3, ISSN 0139-7265, 2009, 51–59.
- Hanuš, O.- Hering, P.- Frelich, J.- Jílek, M.- Genčurová, V.- Jedelská, R.: Reliability of results of milk urea analysis by various methods using artificial milk control samples. *Czech J. Anim. Sci.*, 53, 4, 2008, 152-161.
- Hanuš, O.- Jílek, M.- Ficnar, J.- Beranová, A.- Jedelská, R.- Havlíčková, K.- Míčová, Z.: Možnosti přípravy standardů pro kalibraci nepřímých metod stanovení koncentrace močoviny v mléce. *Živoč. Výr. / Czech J. Anim. Sci.*, 40, 10, 1995, 441-451.
- Hanuš, O.- Klopčič, M.- Kvapilík, J.- Říha, J.- Bjelka, M.- Jedelská, R.- Kopecký, J.: Biologická, analytická a ekonomická podpora monitoringu proteino-energetických dysbalancí ve výživě dojnic a preventivních postupů v prvovýrobě mléka. Biological, analytical and economical support of protein/energetic dysbalances monitoring in the nutrition of dairy cows and preventive procedures in the primary milk production. In *Šlechtitelské, výživářské a technologické aspekty produkce a kvality mléka, sborník referátů*, In Breeding, nutritional and technological aspects of milk production and quality, proceedings of the seminar, 2000, 79-95.
- Hanuš, O.- Skyva, J.- Hofbauer, J.- Klopčič, M.- Genčurová, V.- Jedelská, R.: Věrohodnost výsledků různých analytických metod pro určení koncentrace močoviny v mléce. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. (Brno)*, XLIX, 3, 2001, 143-154.
- Hanuš, O.- Vyletělová, M.- Tomáška, M.- Samková, E.- Genčurová, V.- Jedelská, R.- Kopecký, J.: The effects of sample fat value manipulation on raw cow milk composition and indicators. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LIX, 1, 2011, 101-112.
- Hering, P.- Hanuš, O.- Frelich, J.- Pytloun, J.- Macek, A.- Janů, L.- Kopecký, J.: Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 53, 2, 2008, 64-76.
- Janů, L., Hanuš, O., Frelich, J., Macek, A., Zajíčková, I., Genčurová, V., Jedelská, R., 2007: Influences of different milk yields of Holstein cows on milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Vet. Brno*, 76, 4, 553–561.

- Sojková, K.- Hanuš, O.- Říha, J.- Genčurová, V.- Hulová, I.- Jedelská, R.- Kopecký, J.: Impacts of lactation physiology at higher and average yield on composition, properties and health indicators of milk in Holstein breed. Vlivy fyziologie laktace při vyšší a průměrné užitkovosti na složení, vlastnosti a zdravotní ukazatele mléka dojníc holštýnského plemene skotu. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 41, 1, ISSN 1211-3174, 2010, 21-28.
- Sojková, K.- Hanuš, O.- Říha, J.- Yong, T.- Hulová, I.- Vyleťlová, M.- Jedelská, R.- Kopecký, J.: A comparison of lactation physiology effects at high and lower yield on components, properties and health state indicators of milk in Czech Fleckvieh. Srovnání vlivů fyziologie laktace při vysoké a nižší užitkovosti na složky, vlastnosti a zdravotní ukazatele mléka u Českého strakatého plemene. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 41, 2, ISSN 1211-3174, 2010, 84-91.
- Sojková, K., Hanuš, O., Kopecký, J., Jedelská, R., 2009: Stanovení teplotního gradientu mezilaboratorního transportu vzorků mléka. Determination of thermogradient for interlaboratory milk sample transport. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 187, 3, ISSN 0139-7265, 35-41.

Ne všechny práce ze seznamu literatury (7, 8), jejichž studium a poznatky byly využity ve vývoji metodiky, jsou citovány explicitně v textu vlastní metodiky pro praxi. Jsou však uvedeny v seznamu výše.

### **Přílohy, dokumenty a doklady:**

technická řešení a postupy této certifikované metodiky byly zejména podpořeny výsledky vlastního výzkumu, vývoje a empirických poznatků, které byly publikovány.

Datum: 27. 9. 2011

Za zhotovitele:

Doc. Dr. Ing. Oto Hanuš

Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o.

Za uživatele:

Ing. Zdeněk Růžička v zast. Mgr. Jan Turek

Českomoravská společnost chovatelů, a.s.

.....

.....

Výsledky řešení metodického problému byly formou vyhodnocení zpracovány pro publikace v odborném tisku.

***Certifikovaná metodika pro praxi byla podporována řešením výzkumných záměrů MSM 2678846201 a MSM 2672286101 a projektu INGO LA 09030 a aktivitami Národní referenční laboratoře pro syrové mléko Rapotín.***

### **9) Přílohové materiály s podklady pro vývoj certifikované metodiky**

Přílohy této certifikované uplatněné metodiky (Metody tvorby referenčních vzorků, posouzení kvality kalibrace a výkonnostní testy stanovení močoviny metodou infračervené spektroskopie FT v mléčných laboratořích) tvoří vlastní výsledky vývoje a metodického

testování tzn., publikace, případně manuskripty budoucích publikací a grafické zpracování statistických dat.

## **Přílohy**

- Hering, P.- Hanuš, O.- Frelich, J.- Pytloun, J.- Macek, A.- Janů, L.- Kopecký, J.: Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. *Czech Journal of Animal Science*, 53, 2, ISSN 1212-1819, 2008, 64-76.
- Hanuš, O.- Hering, P.- Frelich, J.- Jílek, M.- Genčurová, V.- Jedelská, R.: Reliability of results of milk urea analysis by various methods using artificial milk control samples. *Czech Journal of Animal Science*, 53, 4, ISSN 1212-1819, 2008, 152-161.
- Sojková, K., Hanuš, O., Kopecký, J., Jedelská, R.: Stanovení teplotního gradientu mezilaboratorního transportu vzorků mléka. Determination of thermogradient for interlaboratory milk sample transport. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 187, 3, ISSN 0139-7265, 2009, 35-41.
- Hanuš, O.- Genčurová, V.- Jedelská, R.- Štolc, L.- Klímová, Z.- Motyčka, Z.- Kopecký, J.: Validace a nejistoty měření koncentrace močoviny a bodu mrznutí mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR-FT) pro laboratoře kvality mléka. Validation and uncertainties of urea concentration and milk freezing point measurement via infrared spectroscopy (MIR-FT) for laboratories of milk quality. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 186, 2, ISSN 0139-7265, 2009, 40-53.