



**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**

**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.

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

Implementace dosažených výsledků, získaných na základě předchozího výzkumu a vývoje  
v rámci řešení projektů MŠMT KONTAKT ME 09081, MSM 2678846201 a MSM  
2672286101 a v rámci koordinační a konzultační metodické činnosti Národní referenční  
laboratoře pro syrové mléko (NRL-SM) Rapotín do prostředí laboratoří kontroly mléčné  
užitkovosti dojníc provozovaných Českomoravskou společností chovatelů, a.s..

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

**projekty MŠMT KONTAKT ME 09081, MSM 2678846201 (RO0311 ze dne 28.2.2011) a  
MSM 2672286101 (RO0511 ze dne 28.2.2011).**

**Zpracovali dne:** 21. 9. 2011; Oto Hanuš<sup>1, 2</sup>, Petr Roubal<sup>3</sup>, Marcela Vyletělová<sup>2</sup>, Ondřej  
Elich<sup>3</sup>, Radoslava Jedelská<sup>1</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 sítě referenčních mléčných laboratoří ICAR-  
CECALAIT a AMA-AFEMA.

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



## **II) Vlastní popis certifikované metodiky**

### **Příprava referenčních vzorků a posouzení kvality kalibrace pro stanovení ketonů jako acetonu metodou infračervené spektroskopie FT v mléčných laboratořích**

#### **Struktura certifikované metodiky:**

- 1) Úvod a současný stav
- 2) Cíl certifikované metodiky
- 3) Vývoj a validace kalibrace MIR-FT pro stanovení acetonu v mléce
- 4) Frekvence kalibrací
- 5) Příprava (odběr vzorků) referenčních standardů pro kalibraci MIR-FT
- 6) Referenční analýzy
- 7) Transport sad referenčních vzorků a výsledků
- 8) Vlastní kalibrace rutinních infraanalyzátorů
- 9) Interpretace výsledků acetonu pro praktické možnosti kontroly zdraví zvířat a kvality resp. technologické způsobilosti syrového mléka
- 10) Závěr certifikované metodiky
- 11) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky
- 12) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci certifikované metodiky
- 13) Přílohové materiály s podklady pro vývoj certifikované metodiky

#### **Použité zkratky:**

AC = aceton

BHB = beta hydroxybutyrát

ČSN = Česká státní norma

LRM = laboratoř rozborů 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

QA/QC = zajištění a řízení jakosti

NEB = negativní energetická bilance

LFA = méně využitelné oblasti

VM = vzorek mléka

## 1) Úvod a současný stav

Je zřejmé, že v souladu s vývojem mlékařské analytiky je aktuálně potřebné výzkumně podrobněji ověřit teoretické a metodické možnosti moderního postupu MIR-FT včetně podmínek jeho kalibrace pro jeho další rutinní nasazení v kontrole mléčné užitkovosti a v kontrole kvality mléka.

### ***Ketóza jako produkční onemocnění***

Ketóza reprezentuje metabolické onemocnění, které se vyskytuje hlavně u vysoce produktivních dojnic. Základní problém ketóz spočívá v deficitu glukosy v krvi a tkáních, který spolu s nedostatkem vhodných uhlovodíků v krmné dávce vede k odbourávání lipidů v játrech. Zvýšený metabolismus jater vede ke zvýšení hladin vedlejších produktů - ketolátů v krevním séru a následně i v mléce dojnice. Ketózy všeobecně jsou v období vzniku tzv. „energetické díry“ resp. negativní energetické bilance po otelení způsobené vyšším výdejem živin laktací z organismu oproti nižšímu přívodu. Jsou charakterizovány odbouráváním tělesných energetických (především tukových) rezerv. Tento jev může vést až k poklesu metabolické funkce jater jejich infiltračním tukem (syndróm lipomobilizace až jaterní steatózy) nebo jaternímu kómatu. Zde je důležitou vlastností regenerační schopnost jater (Obr. 1 a 2). Průběžně dochází právě ke vzrůstu obsahu ketonových látek v tělních tekutinách.

Obsah ketolátů (acetonu, acetoacetátu a BHB (betahydroxybutyrátu)) v individuálních vzorcích mléka je tedy indikátorem zdravotního stavu dojnic po porodu a v první třetině laktace ve smyslu výskytu produkčního onemocnění, ketóz. Některé ketony mohou být dále metabolizovány, jiné (např. aceton) odcházejí z organismu zpravidla močí, dechem, potem a mlékem. Ketóza vzniká především u dojnic s vysokou dojivostí a vykazuje plíživý charakter nástupu a setrvačnost průběhu. V průběhu ketózy je redukována dojivost i obranyschopnost (riziko zvýšeného výskytu nových mastitidních infekcí) a zhoršena plodnost krav. Mnohé výše zmíněné jevy jsou v omezenějším rozsahu pozorovány i u volně žijících savců. U hospodářských zvířat se zaměřením na vysokou užitkovost se uvedené procesy mohou nicméně vymykat kontrolním a regulačním mechanismům organismu. Dojde k onemocnění ketózou zpravidla nejdříve v subklinické a posléze klinické formě. Kromě dalších příznaků může onemocnění vyústit i v úhyn zvířete. Léčba je nezbytná, avšak s důsledky všech ztrát nákladná.

MIETTINEN (1994) našel negativní korelaci mezi koncentrací acetonu v mléce a mléčnou užitkovostí. U neklinicky ketózních krav byla kalkulována ztráta mléčné užitkovosti v důsledku zvýšení acetonu v mléce na 2 až 9 % a u klinicky ketózních krav na 26 a více %. LESLIE (1999) je v této souvislosti názoru, že existuje stále více svědectví dokládajících, že většina mléčných stád by profitovala z rutinního monitorovacího programu pro subklinické ketózy, neboť pozitivní test má dobrou předpovědní hodnotu pro blížící se problémy. Použitelnost stádového kontrolního programu je nejvíce ovlivněna citlivostí a pozitivní predikční hodnotou testu stejně jako náklady na test.

Prevence je významná, neboť frekvence výskytu ketóz ve výživově problémových stádech může dosahovat v první třetině laktace až 13 %, subklinických pak až 34 %. Frekvence ketóz celkem v běžném stádě činí cca 4 %, v problémovém stádě až 8 % z právě laktujících krav (KAUPPINEN, 1983; UNGLAUB, 1983; ANDERSSON a EMANUELSON, 1985; ŠRÁMEK et al., 1992; HANUŠ et al., 1999; RASMUSSEN et al., 1999).

## *Význam ketonů (acetonu) v mléce*

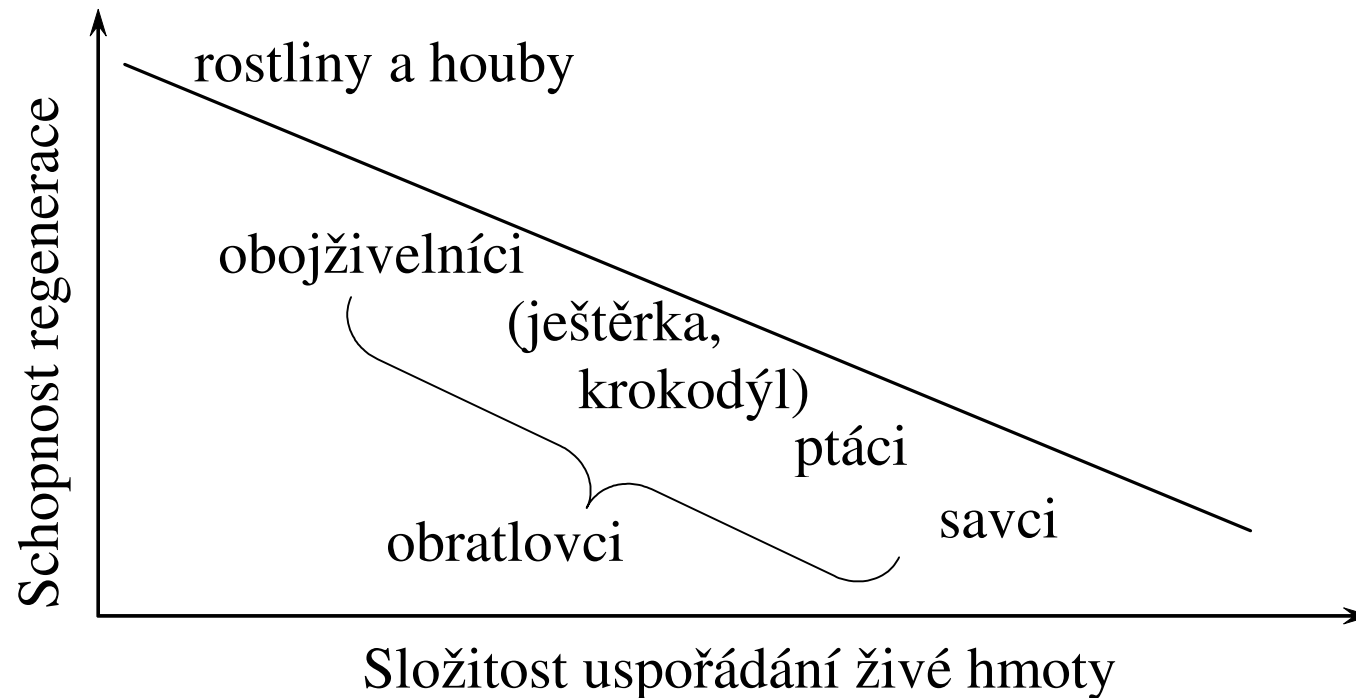
Vhodným ukazatelem energetického metabolismu ve smyslu koncového stupně katabolismu tělesných tukových rezerv a rozvoje ketózy u krav je koncentrace ketonů, resp. acetonu (AC) v mléce (ANDERSSON, 1984, 1988; ANDERSSON a LUNDSTRÖM, 1984 a, b; ANDERSSON a EMANUELSON, 1985; EMANUELSON a ANDERSSON, 1986; GRAVERT et al., 1986; DIEKMANN, 1987; GUSTAFSSON a EMANUELSON, 1993; MOTTRAM, 1996; GEISHAUSER et al., 1997, 1998; HANUŠ et al., 1999, 2001 a; MOTTRAM a MASSON, 2001; MOTTRAM et al., 2002; WOOD et al., 2004). AC je metabolický mléčný ukazatel, podle kterého lze úspěšně kontrolovat negativní energetickou bilanci (NEB) krav. NEB je rizikové období v počátku laktace, zpravidla s vyšším AC v mléce.

Všeobecně je známo, že zejména v méně využitelných oblastech (LFA) existují určité problémy s možností zajistit dostatečné energetické živinové zdroje pro dojnice v rámci základny přirozených a konzervovaných objemných krmiv. Nicméně, hladina mléčného acetonu nebyla významně ovlivněna prostřednictvím nadmořské výšky (geometrický průměr 1,8 v nížině oproti 1,7 mg.l<sup>-1</sup> na vysočině; HANUŠ et al., 2005). V předešlé práci (HANUŠ et al., 1999) byl přesto naznačen vyšší obsah AC u krav s výskytem NEB (vysoká ztráta skóre tělesné kondice v první třetině laktace) ve srovnání ke kravám s normální poporodní ztrátou tělesné kondice ( $P < 0,001$ ), kde byly aritmetické průměry  $9,3 \pm 13,3 > 6,4 \pm 7,0$  mg.l<sup>-1</sup> a korespondující geometrické průměry  $6,0 > 4,4$  mg.l<sup>-1</sup> ( $n = 1559$  a  $5193$ ). Rozdíl činil 2,9 mg.l<sup>-1</sup>. ŘÍHA a HANUŠ (1999) a HANUŠ et al. (2000) uvedli také významné ( $P < 0,05$ ; Obr. 3) zhoršení reprodukce dojnic (servis perioda o 19 dní a inseminační index o 0,27) v závislosti na zvýšení AC (od  $< 5$  do  $> 20$  mg.l<sup>-1</sup>), kdy stavy již odpovídaly projevům závažnější subklinické a klinické ketózy. Také WALDMANN et al. (2003) předpověděli vzrůst pravděpodobnosti opakované inseminace při vzrůstu koncentrace acetonu v mléce při inseminaci.

U krav se zvýšeným obsahem acetonu ve druhém a třetím měsíci laktace ( $> 0,25$  mmol.l<sup>-1</sup>) byla zjištěna významná negativní korelace ( $r = -0,47$  resp.  $-0,42$ ) k množství energie přijaté krmivem a rovněž k mléčné užitkovosti ( $r = -0,30$ ; GRAVERT et al., 1991). Z toho vyplývá, že vysoký obsah acetonu v mléce indikuje labilní látkovou výměnu u krav. Významným vlivem na obsah acetonu v mléce je však i kvalita siláží. Koeficient heritability pro obsah acetonu v mléce činil 0,30 (GRAVERT et al., 1991) pro první tři měsíce laktace a podobal se tak koeficientu mléčné užitkovosti. Proto bylo doporučeno zařazení hodnocení obsahu acetonu v mléce jako ukazatele energetické bilance do sledování kontroly užitkovosti, včetně stanovení plemenné hodnoty. Genetické (plemenné) aspekty výskytu subklinické a klinické ketózy a hladiny mléčného acetonu byly studovány ve více pracích (EMANUELSON a ANDERSSON, 1986; MÄNTYSAARI et al., 1991; HANUŠ et al., 2003; WOOD et al., 2004). Použití AC v mléce během laktace jako ukazatele energetického stavu pro genetické zlepšení příjmu krmiva a využití energie dojnici bylo tak doporučeno vícekrát (DIEKMANN, 1987; GRAVERT et al., 1986, 1991). Již dříve (HANUŠ et al., 2004 a) byl také nalezen pozitivní korelační koeficient ( $r = 0,30$ ;  $P < 0,001$ ) mezi log koncentrací acetonu a koeficientem tuk/bílkoviny v kravském mléce jako dalším ukazatelem energetického metabolismu krav (Obr. 4). Tento potvrzoval uvedenou vypovídací schopnost obou ukazatelů. Aceton v krvi a mléce je přitom vysoce korelován ( $r = 0,96$ ; ENJALBERT et al., 2001).

# Obr. 1 Regenerace v biologii - obnova porušené celistvosti a funkčnosti

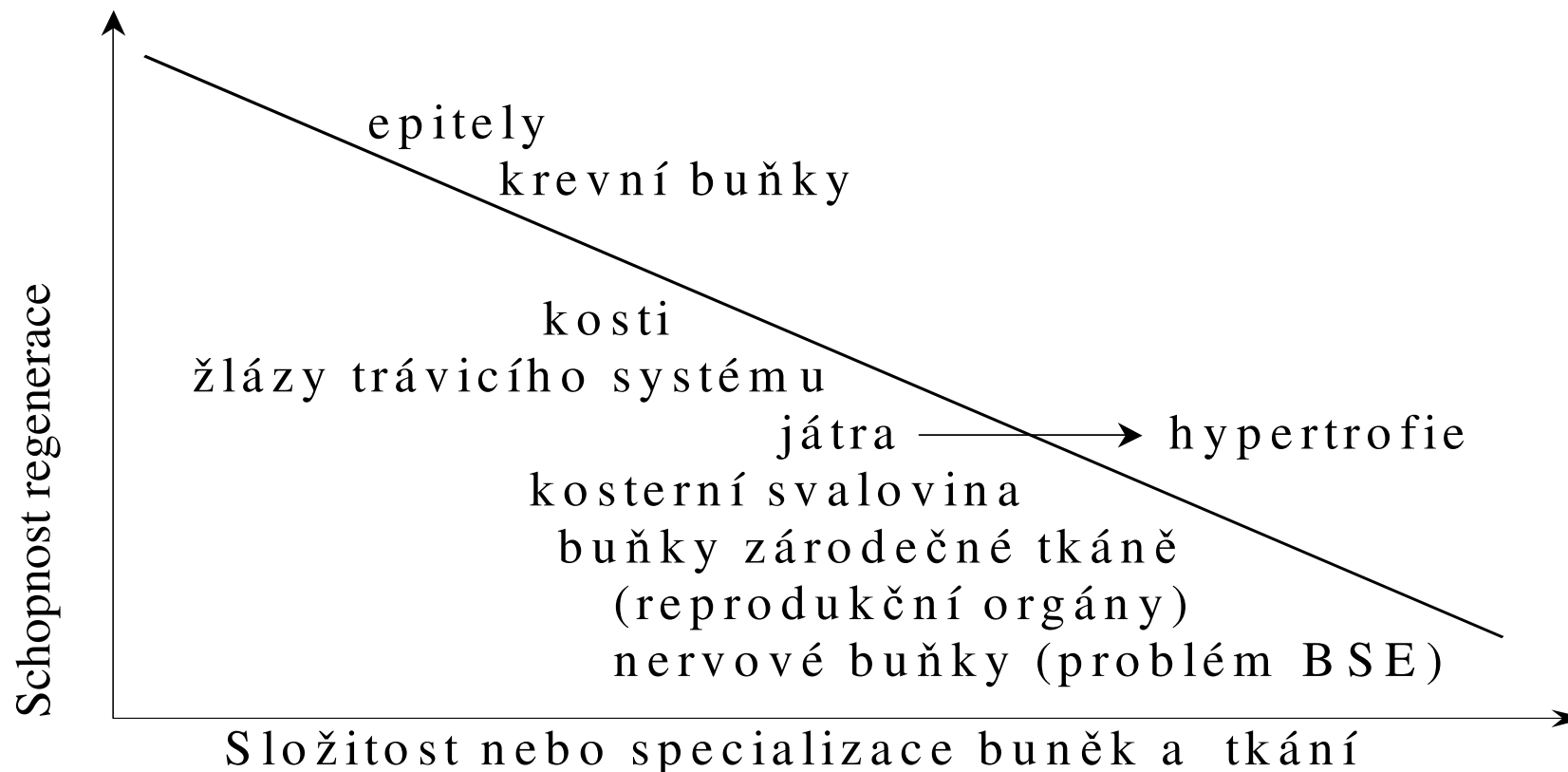
(na úrovni taxonomických jednotek).



Schopnost regenerace je různá, vzrůstá obecně s klesající organizovaností živé hmoty, resp. říší, kmenů, tříd a druhů jako taxonomických biologických jednotek.

Pozn.: fyziologická regenerace – epitely, krevní buňky – náhrada opotřebených buněk  
patologická (reparační) regenerace – náhrada násilně ztracených částí

## Obr. 2 Regenerace živočišných buněk tkání a orgánů

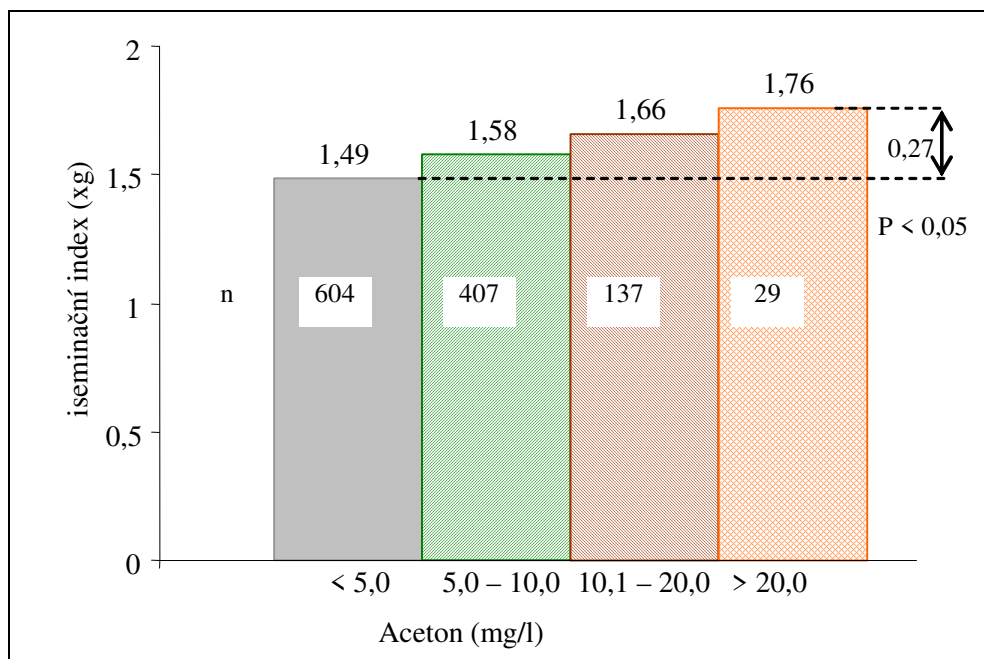
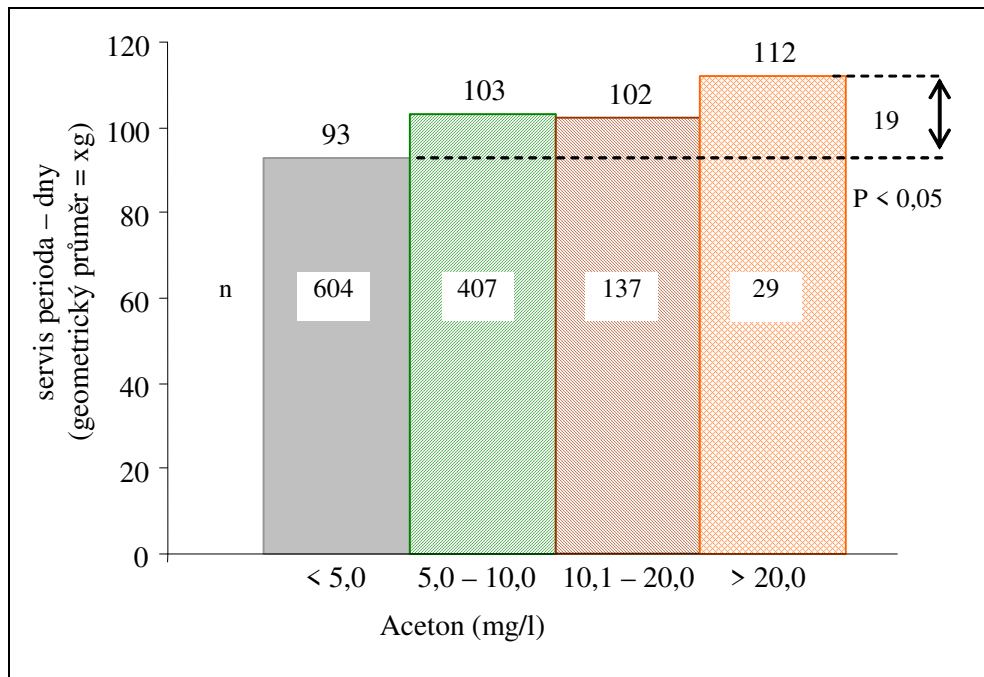


(na úrovni savců) – náhrada a obnovení živočišné tkáně tkání, která je fyziologicky rovnocenná.

Schopnost regenerace je různá, obecně klesá se zvyšující se složitostí nebo specializací buněk, tkání a orgánů.

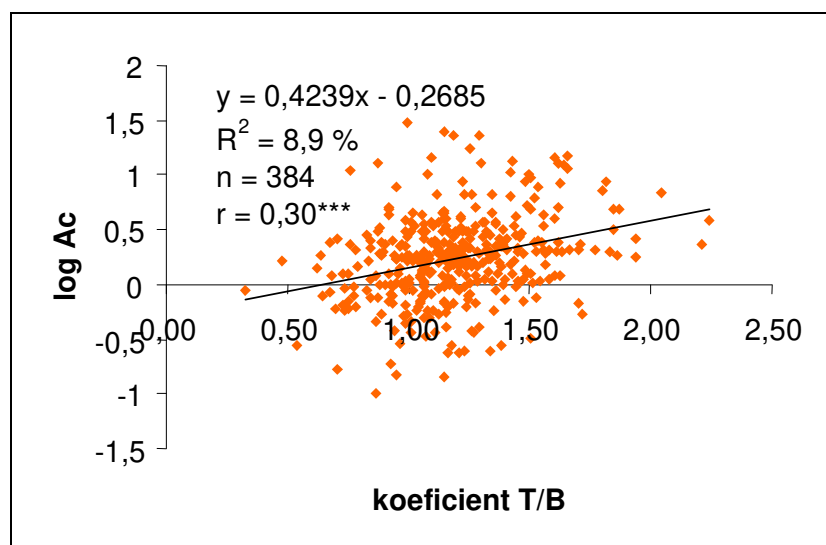
Pozn.: Kompenzační hypertrofie – zvětšení buněk až do požadované funkce orgánu; u jater je rozdílná situace, jsou-li buňky infiltrovány tukem (ketóza, jaterní steatóza), podobně např. vaječníky = ztráta funkčnosti (ztučnění, ketóza).

Obr. 3 Vztah hladin acetonu v mléce dojnic (individuální vzorky) v prvních třech měsících laktace k některým ukazatelům plodnosti.



(ŘÍHA a HANUŠ, 2000)

Obr. 4 Vztah mezi koeficientem T/B a obsahem acetonu v mléce krav.



Zejména prevence je velmi významná pro snížení ekonomických ztrát, které mohou být ketózou zapříčiněny. Účinná diagnóza a monitoring jsou nezbytné pro dobrou prevenci subklinických stavů ketózy (ANDERSSON, 1988; HANUŠ et al., 1999, 2001). Ovšem diagnostická hladina (relevantní diskriminační limit ketonů nebo AC) není v literárních zdrojích stále přijatelně sjednocena. Tato se pohybuje od 2 do 41 mg.l<sup>-1</sup> (od 0,03 do 0,7 mmol.l<sup>-1</sup>; GUSTAFSSON a EMANUELSON, 1993) pro AC v mléce. Většinou je to od 7 do 23 mg.l<sup>-1</sup> (od 0,12 do 0,4 mmol.l<sup>-1</sup>; GRAVERT et al., 1986; HANUŠ et al., 1999; MIETTINEN, 1995; GASTEINER, 2000). Určení diskriminačního (diagnostického prahu) limitu závisí na definici subklinické ketózy, to znamená bez výskytu klinických příznaků u dojnic. Toto bylo někdy deklarováno jako určitý propad denní mléčné užitkovosti (GUSTAFSSON a EMANUELSON, 1993) v průběhu časně laktace, jindy jako určitá ztráta score tělesné kondice (BCS; HANUŠ et al., 1999). Metoda BCS byla také hodnocena ve smyslu předpovědi negativní energetické bilance dojnic (HEUER et al., 1999; GASTEINER, 2003) v rámci prevence ketózy. Obecně více autorů (EMERY et al., 1964; VOJTÍŠEK et al., 1991; MIETTINEN, 1995; GREEN et al., 1999; GASTEINER, 2003) se pokusilo pozitivně pozměnit metabolismus časně laktace a korespondující možný nedostatek energie cestou přídavek různých glukoplastických nebo hepatoprotektivních látek (jako propylenglykol, monensin, *Silybum marianum*) do krmných dávek krav.

Metabolické mléčné ukazatele jako ketony ovlivňují rovněž technologické vlastnosti a tím i zpracovatelnost mléka. Např. (HANUŠ et al., 1993 a, b) byly nalezeny, i když méně těsné, přesto významné negativní korelační vztahy obsahů močoviny a acetonu v přirozených vzorcích kravského mléka ke kysací schopnosti ( $r = -0,23$  a  $-0,21$ ;  $P < 0,05$ ), ačkoliv samotné umělé přídávky těchto nežádoucích metabolitů do mléka vedly k redukci kysací schopnosti až ve velmi silných, prakticky fyziologicky i patologicky nereálných koncentracích. Je pravděpodobné, že zmíněné omezení kysací schopnosti v přirozeném mléce nemusí být dáno přímými účinky těchto nežádoucích metabolitů samotných, jako spíše celkově změněnou kompozicí a vlastnostmi mléka u zvířat energeticky strádajících. Samotné vysoké hladiny ketonů v tělních tekutinách pak, jak známo, mohou také negativně ovlivňovat imunitní schopnosti organismu, např. fagocytární schopnosti leukocytů.

### *Některé metody stanovení acetonu v mléce*

Aby byl poskytnut efektivní diagnostický prostředek, byl vyvinut mléčný test Ketotest pro usnadnění monitoringu a řízení prevence ketóz. Cílem bylo usnadnit identifikaci subklinické ketózy. Za předpokladu platnosti vztahů uvedených v pracích BERGMAN (1971), ANDERSSON (1984), ANDERSSON a LUNDSTRÖM (1984), VOJTÍŠEK (1986) a HLÁSNÝ (1995) lze z výsledků odhadovat, že poměr mezi obsahy acetonu v mléce a moči, daný fyziologicko-patologickými principy a jejich vzájemnými poměrovými kombinacemi, může být, v závislosti na zdravotním stavu organismu, cca 1 : 10 až 1 : 35. Uvedené, při limitu subklinické ketózy 10 mg/l acetonu v mléce, odpovídá 100 až 350 mg/l acetonu v moči. Tolikrát nižší koncentrace v mléce je specifickým konstrukčně-technologickým problémem pro dosažení potřebné citlivosti mléčných testů pro ketózy, resp. na ketony nebo aceton. Proto mnohé snahy o získání takové citlivosti nebyly úspěšné s výjimkou několika málo diagnostik včetně Ketotestu. Bylo nezbytné vynést barevnou nitroprusidovou reakci zamlženou v koloidním roztoku mléka na pevný podklad pro její zviditelnění, čehož bylo mimo jiné dosaženo precipitací mléčných proteinů na povrchu reakční směsi reagentie a plnidla s mlékem (JÍLEK 1999). Korelace mezi výsledky Ketophanu v moči a Ketotestu v mléce činila 0,87 ( $P < 0,001$ ; HANUŠ et al., 2001 c).

Přes uvedené výsledky by bylo velmi efektivní vyvinout rychlou, kvantitativní analytickou metodu s věrohodnými výsledky pro sériové analýzy individuálních vzorků mléka v rámci rutinní kontroly mléčné užitkovosti. To by při dané operativě a možnostech při organizaci prevence, případně vhodných nápravných opatření ve výživě, nesporně vedlo k podpoře zdravotního stavu dojníc, zlepšení jejich reprodukčních vlastností a zajištění vyšší kvality syrového mléka jako potravinářské suroviny. ENJALBERT et al. (2001) uvedli, že určení beta-hydroxybutyrátu v mléce enzymatickou analýzou nebo proužkovým testem Ketolac poskytuje hodnotné výsledky s prahovou koncentrací 70 až 100 mikromol/l. Kladně hodnotili praktickou jednoduchost Ketolacu.

ROOS et al. (2006) hodnotili na základě odečtu acetonu, acetátu a beta-hydroxybutyrátu v individuálních vzorcích mléka pomocí kalibrované infračervené metody MSc FT 6000 (MIR-FT) sensitivitu (70 %), specifitu (95 %) a procento falešně pozitivních (27 %) a falešně negativních (7 %) odečtů s ohledem na schopnost metody k identifikaci stavu subklinické ketózy dojníc. Výzkum aplikace metody byl tak označen za ještě vhodný pro praktický monitoring onemocnění. Práce s identifikací acetonu nebo ketózy v mléce pomocí kalibrované infračervené spektroskopie na principu MIR-FT provedl rovněž HANSEN (1999), který zjistil u vzorků kolísajících od 0,0 do 2,8 mM acetonu a při koeficientu determinace 0,81 a správnosti 0,27 mM uspokojivou přesnost pro klasifikaci dojníc do dvou skupin, zdravá a pravděpodobně ketózní, a HEUER et al. (2001), zde byl zjištěn treshold (práh) pro subklinickou ketózu v hodnotě od 0,4 do 1,0 mM. Myšlenku monitorovat ketózy systematicky a automaticky ve stádech dojníc v on-line systémech prostřednictvím měření hladin ketonů nebo acetonu (v mléce nebo ve vydechaném vzduchu) pomocí vestavěných biosensorů prosazovali MOTTRAM (1996), MOTTRAM a MASSON (2001) a MOTTRAM et al. (2002).

Efektivitu MIR-FT uvedenou autory ROOS et al. (2006) by však bylo účelné zlepšit vývojem účinnější metody. Proto postup vhodné modifikace kalibrace MIR-FT (metoda jak vytvořit kalibrační sadu s relevantním variačním rozpětím pro docílení přijatelných statistických charakteristik kalibrace, zda na mléce nativním a jak toto selektovat nebo s umělými přísadami ketonů, jak kontrolovat opakovatelnost a recovery, specifikovat a limitovat přijatelné statistické parametry kalibrace) by měl být předmětem metodického výzkumu pro

možné zvýšení identifikační účinnosti metody MIR-FT. Běžná fotometrická mikrodifúzní metoda (MFM) se salicylaldehydem (VOJTÍŠEK, 1986; HANUŠ et al., 1993, 1999, 2001b, c) nemůže v tradičním designu naplnit požadované ukazatele efektivity pro praktické nasazení v kontrole užitkovosti ve smyslu výkonnosti.

## 2) Cíl certifikované metodiky

Obecným cílem certifikované metodiky je zvýšit provozní jistotu referenčních a rutinních mléčných laboratoří při nepřímém, sériovém a simultánním stanovení acetonu v mléce a následně také zvýšit provozní jistotu chovatelů vysoce užitkových dojnic interpretací dosažených výsledků.

Konkrétním cílem vlastní certifikované metodiky tedy je:

- ověřit možnosti moderní infračervené metody MIR-FT ve smyslu její kalibrace ke stanovení acetonu (ketonů) v mléce;
- vyvinout prakticky použitelnou metodu přípravy relevantních referenčních standardů;
- popsat a vyhodnotit aspekty kalibrace a věrohodnosti výsledků;
- ověřit možnosti výkonnostního testování při determinaci daného analytu;
- shrnout praktické aspekty interpretace výsledků acetonu v mléce s ohledem na monitoring zdravotního stavu dojnic a možnosti prevence problémových situací ve výživě dojnic a jejich případných produkčních poruch (energetického deficitu (NEB), resp. ketóz).

## 3) Vývoj a validace kalibrace MIR-FT pro stanovení acetonu v mléce

### *Referenční a nepřímé stanovení acetonu v mléce*

Při vývoji této metodiky byl aceton vyšetřován prostřednictvím spektrofotometrického měření při vlnové délce 485 nm na zařízení Spekol 11 (Carl Zeiss Jena, Germany). AC byl absorbován v alkalickém roztoku KOH se salicylaldehydem (O'MOORE, 1949; VOJTÍŠEK, 1986; VOJTÍŠEK et al., 1991) cestou 24 hodinové mikrodifúze ve speciálních skleněných hermeticky uzavřených nádobách v temnu za teploty 25 °C pro vzorky i škálu referenčních vzorků. Spekol byl kalibrován pomocí pětibodové referenční vzorkové škály se vzrůstajícím acetonem od 1 do 20 mg.l<sup>-1</sup>. Postup byl použit k určení referenčních hodnot.

Jako nepřímá metoda, která byla kalibrována za uvedených podmínek, byla použita metoda MIR-FT (mid infrared, středová infračervená spektroskopie s Fourierovými transformacemi) v technickém provedení Lactoscope FT-IR (Delta Instruments, Holandsko) a MilkoScan FT 6000 (M-Sc; Foss Electric, Dánsko) v Národní referenční laboratoři pro syrové mléko (NRL-SM) Výzkumného ústavu pro chov skotu v Rapotíně a v Laboratoři pro rozборы mléka (kontrola kvality mléka a kontrola užitkovosti) v Buštěhradu Českomoravské společnosti chovatelů Praha. S přístroji se pracovalo podle návodu výrobce.

### *Statistické vyhodnocení kalibrací a validace výsledků*

Koncentrace acetonu v mléce byly použity v původních hodnotách (mg.l<sup>-1</sup>) a po logaritmické transformaci, protože soubory dat AC zpravidla nevykazují normální frekvenční distribuci (MELOUN a MILITKÝ, 1992, 1994; HANUŠ et al., 2000, 2001 a, b). Za této situace nemusí být aritmetický průměr vhodným reprezentativním ukazatelem datových souborů AC. Transformace naopak umožňuje v případě potřeby práci s geometrickými průměry AC i testování jejich diferencí. K vyhodnocení výsledků kalibrací a validace byla využita vedle

určení průměrných diferencí (nepřímá metoda – referenční hodnoty) a jejich směrodatných odchylek také metoda regresní analýzy a srovnání korelačních koeficientů. Podobně bylo pracováno s hodnotami acetonu při zpracování praktických interpretačních postupů.

### ***Výsledky ketonů, pokusné postupy, krátké shrnutí***

**I)** Byla shledána dobrá korelace ( $r = 0,89$ ,  $P < 0,001$ ) mezi výsledky log A a log BHB z MIR-FT (původní nastavení) v LRM Buštěhrad na souboru individuálních vzorků mléka ( $n = 224$ ), což je fyziologicky logický a slibný výsledek. Vztah výsledků MIR-FT k nějaké referenční metodě nebyl posuzován.

**II)** Byla vytvořena sada referenčních vzorků mléka ( $n = 11$ ) podle výsledků MIR-FT na obsah AC (log). Tato byla změřena na referenční hodnoty a kontrolována na MIR-FT. Nebyly nalezeny žádné interpretovatelné vztahy mezi referenčním určením acetonu a měřením MIR-FT. Výsledky méně slibné. Nicméně, referenční sada vykazovala velmi malý variační obor s ohledem na možnost identifikace subklinických ketóz.

**III)** Byla vytvořena sada referenčních vzorků mléka ( $n = 37$ ) na obsah AC (log) podle výsledků MIR-FT a podle vyšetření veterinárního lékaře s ohledem na vyšší podezření z výskytu ketóz u dojnic daného stáda. Tato byla změřena na referenční hodnoty a kontrolována na MIR-FT. Pro MIR-FT v LRM Buštěhrad (M-Sc) byl nalezen nižší, ale pozitivní vztah ( $r = 0,59$  a  $0,50$  pro log AC a log BHB) mezi referenčním určením acetonu (NRL-SM Rapotín) a měřením MIR-FT. Výsledky byly slibnější, avšak i tato referenční sada vykazovala poměrně velmi malý variační obor s ohledem na možnost identifikace subklinických ketóz. Lze proto konstatovat, že variační obory referenčních sad II a III byly nevhodné.

**IV)** Do vzorku mléka byl uměle přidán AC pro jeho zvýšení. AC byl zvýšen ve VM metodou umělého přídavku z referenčních standardů (vodných roztoků) kalibrační přímky metody Spekol o 10 jako minimální a 40  $\text{mg.l}^{-1}$  jako maximální přídavek AC do mléka s přibližně 5  $\text{mg.l}^{-1}$  základního obsahu AC. Výsledky modifikace byly měřeny metodou Re a MIR-FT (Delta); Vzorky byly měřeny příslušnými metodami. Nebyl zaznamenán přídavek AC na MIR-FT (Delta v Rapotíně, kalibrace podle souboru II), ale referenční metodou ano. Metoda umělého přídavku AC pro dosažení horních hodnot kalibrační přímky při kalibraci MIR-FT se ukázala nefunkční s ohledem na nulovou recovery. Výsledky nedostatečné pro možnost umělých modifikací případných referenčních standardů.

**V)** Individuální vzorky mléka ( $n = 14$ ) byly odebrané v chovu vysoceužitkových holštýnských dojnic (10 000 kg za normovanou laktaci), kde existovala vysoká pravděpodobnost výskytu ketóz z dřívějších vyšetření. V dojrně byla vzorkována zvířata v prvním měsíci laktace při ranním dojení. Cílem bylo získat především vyšší hodnoty AC a přijatelný variační obor kalibrační sady vzorků pro možnost objektivního posouzení vzájemných vztahů výsledků zahrnutých metod pro určení AC v mléce. Získané vzorky mléka byly analyzovány na obsah AC referenční metodou (Re) a výsledky byly porovnány s metodou MIR-FT (M-Sc a Delta).

Průměr referenční sady pro AC (fotometricky, Rapotín) byl  $10,1 \pm 9,74$  ( $v_x = 96,4 \%$ ) při geometrickém průměru  $7,26 \text{ mg.l}^{-1}$ . Variační obor této referenční sady od 1,98 do  $33,66 \text{ mg.l}^{-1}$  byl vyhovující s ohledem na principy a praxi diagnostiky subklinické ketózy pomocí analýzy tělních tekutin na zvýšený obsah ketonů. Vzdor tomu určitou nevýhodou byla nižší frekvence vyšších hodnot ( $> 20 \text{ mg.l}^{-1}$ , vysoká pravděpodobnost subklinické ketózy) ve vzorkové sadě,

kteřá činila 21,4 %. Prakticky výhodná hodnota k danému účelu by byla 50 % metodou kvalifikovaného odhadu.

Korelační vztah AC mezi referenční metodou a MIR–FT Delta byl 0,32 ( $P > 0,05$ ). To znamená, že nebyl výrazný a zhoršil se po přijetí kalibrace (0,24). Výsledek kalibračního experimentu tedy nebyl přesvědčivý.

Výrazně lepší byl vztah (AC) mezi referenční metodou a MIR–FT M–Sc. Korelační koeficient činil 0,80 ( $P < 0,01$ ). To znamená, že 64,5 % variací v acetonu bylo vysvětlitelných variabilitou AC v referenčních hodnotách. Zajímavý byl také stejný metodický vztah pro výsledky log AC referenční metodou a log BHB instrumentálně v hodnotě 0,58 ( $P < 0,05$ ). Otázkou z analytického hlediska zde tedy zůstává jen přepočtené a pro praxi přijatelné vyjadřování výsledků v dohodnutých jednotkách (interpretace jednotek koncentrace).

Korelace v sadě mezi log AC a log BHB na jednom přístroji MIR–FT M–Sc byla vysoká a činila 0,90 ( $P < 0,001$ ), což je logické ve vztahu k dynamice ketózy u zvířete, jako u hodnocení I a podle přiloženého grafu. To znamená, že 81,2 % výsledkové variability v log BHB je vysvětlitelných variabilitou přístrojových výsledků v log AC.

Přepočet  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  z vybraných vztahů výsledků AC v mléce referenční metodou na log AC a log BHB pomocí MIR–FT M–Sc by mohl činit  $> -0,80$  a  $> -1,66$  z hlediska interpretace diskriminační limitní hodnoty problému ketóz (viz přiložený interpretační graf a tabulka, Obr. 7, Tab. 1) – podezření na subklinickou ketózu.

Výsledky lze označit za slibné pro monitoring ketóz u individuálních vzorků mléka z kontroly užitkovosti. Vhodným sestavením kalibrační sady a také vhodnými transformacemi hodnot stejně jako účelným výběrem z nabídky možných kombinací uvedených variant se jeví jako reálné docílit prakticky použitelné výsledky v monitoringu ketóz.

### ***Závěr z pokusných postupů***

- Je možné konstatovat, že výsledky log A a log BHB v LRM Buštěhrad prostřednictvím MIR–FT jsou způsobilé k použití v monitoringu výskytu ketóz krav v mléčných stádech v kontrole užitkovosti na poměrně dobré úrovni spolehlivosti výsledků.
- Doporučuje se provádět monitoring v individuálních vzorcích mléka ve stádech nad 7000 kg mléka za normovanou laktaci v prvních třech měsících laktace.
- Doporučuje se kontrolovat kalibraci MIR–FT jedenkrát až dvakrát ročně vybraným referenčním postupem.
- Otázkou je limitní hodnota log A a log BHB pro identifikaci klinické ale zejména subklinické ketózy pomocí MIR–FT.
- Pro začátek by bylo možné doporučit při monitoringu prvních třech měsíců laktace ve stádech s dojivostí nad 7000 kg mléka za normovanou laktaci označit za podezřelých z ketózy 10 procent nejvyšších hodnot log A a log BHB v souboru relevantního stáda.
- Další zpřesnění postupu nejlépe po statistice určitého počátečního období pravidelného monitoringu.

### **4) Frekvence kalibrací**

Frekvence kalibrací metod MIR–FT pro určení ketonů (acetonu) v mléce není legislativně závazně upravena. Intervaly mohou být metodou kvalifikovaného odhadu tří- šesti- až

dvanáctiměsíční. Výsledky naznačují, při funkčnosti techniky (mimo závažné opravy optického nebo homogenizačního systému), že interval roční by mohl být uspokojivý. Pro plynulost zajištění měřících funkcí v laboratorní pracovní síti přístrojů (opravy přístrojů znamenají pak nutnost individuálních mimotermínových recalibrací) se však prakticky doporučuje interval půlroční.

## **5) Příprava (odběr vzorků) referenčních standardů pro kalibraci MIR-FT**

- Referenční sada vzorků obsahuje minimálně 15, lépe však 20 až 30 reprezentativních individuálních vzorků mléka, pokud možno vyváženě od obou hlavních dojených plemen skotu (holštýnské a české strakaté) v České republice. Je však pravděpodobné vyšší až úplné zastoupení jen plemene Holštýn s ohledem na vyšší užitkovost.

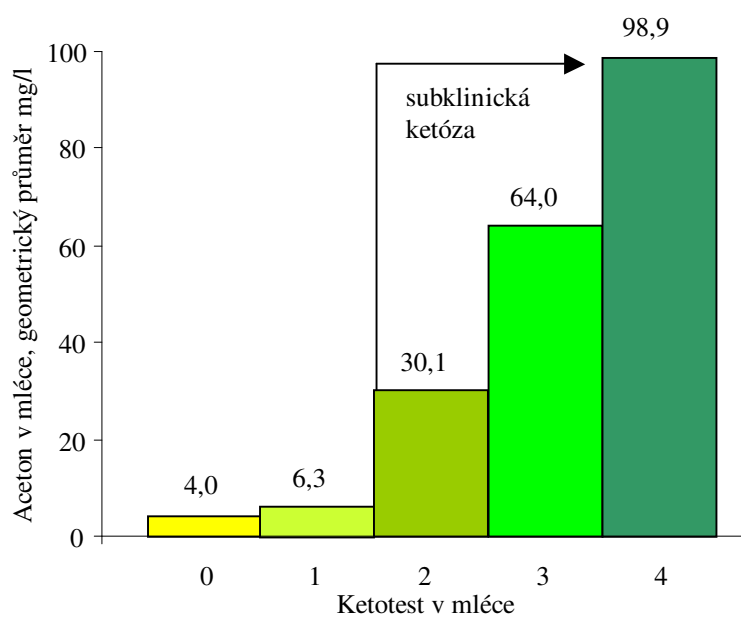
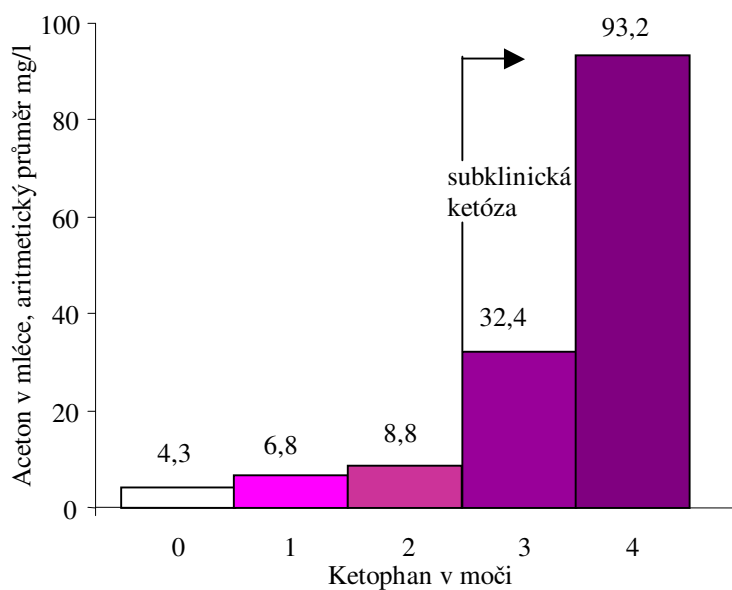
- V referenční sadě je potřebné rovnoměrné zastoupení vzorků s potřebnou škálou hodnot acetonu, od nízkých (0 až 10 mg/l) až po vysoké (do 30 až 50 mg/l). Toho je třeba docílit specifickým výběrem zvířat v souladu s fyziologickými projevy.

- Individuální vzorky mléka se odeberou v chovu nebo chovech vysoceužitkových (pravděpodobně holštýnských, ale zastoupení plemene české strakaté je rovněž žádoucí pro lepší vybalancování prakticky reálných interferenčních efektů pro metodu MIR-FT) dojníc (nejlépe kolem 10 000 kg za normovanou laktaci). Výběr je založen na fyziologických pravidlech laktace a patologických projevech ketóz. Zde existuje vysoká pravděpodobnost výskytu ketóz. Cílem je získat především vyšší hodnoty AC a přijatelný variační obor kalibrační sady vzorků pro možnost objektivního posouzení vzájemných vztahů výsledků zahrnutých metod pro určení AC v mléce. Tento výběr vzorků je pravděpodobnostní a předpokládá se implicitně záchyt i nízkých hodnot (obvykle 50 až 60 %) při daném systému odběru vzorků cíleném na vyšší hodnoty.

- Předpokladem tedy je odebrat vzorky výběrově ve vysoceužitkovém stádě od vysoceužitkových dojníc v počátku jejich laktace (od 10 do 65 dne laktace), lépe od zvířat na druhé a vyšší laktaci. Nezáleží, zda se jedná o vzorky z ranního, večerního nebo celkového nádoje.

- Protože není jednoduché zajistit požadovaný rozsah hodnot acetonu (zejména strop kalibrační škály) na bázi nativních vzorků, aby odběry nebyly příliš nákladné, lze doporučit podporu metody cíleného, ale pravděpodobnostního odběru ověřením obsahu ketonů pomocí rychlých stájových testů (např. Ketotest; HANUŠ et al., 1999) přímo na místě. Tyto umožní znát výsledek do 20 minut. Je pak možné vhodněji vybrat vzorky do potřebné škály. Orientovat se v semikvantitativním odhadu lze podle grafického znázornění na Obr. 5 a 6. Orientace odběru u zvířat podle koncentrace ketonů v moči je možná, ale postup odběrů se tak komplikuje (HANUŠ et al., 2001 b, c) a vzrůstají odborné pracovní náklady a nároky na čas.

Obr. 5 Obsahy acetonu v mléce pro jednotlivé třídy reakce Ketophanu v moči.



Obr. 6 Obsahy acetonu v mléce pro jednotlivé třídy reakce Ketotestu v mléce.

## 6) Referenční analýzy

- Bezprostředně po odběru se vzorky sady zpracují referenční metodou. Lze použít metodu stanovení acetonu prostřednictvím spektrofotometrického měření při vlnové délce 485 nm, která již byla uvedena. AC je absorbován v alkalickém roztoku KOH se salicylaldehydem (O'MOORE, 1949; VOJTÍŠEK, 1986; VOJTÍŠEK et al., 1991)

## 7) Transport sad referenčních vzorků a výsledků

- Bezprostředně po přípravě (5) se provede transport sady referenčních vzorků z centrální referenční laboratoře do rutinních laboratoří s dobou dodání do 24 hod. (spěšná vlaková zásilka). Vzorky se rozpipetují do čistých vzorkovnic o potřebném objemu pro přístroj. Konzervační prostředek, bronopol (2-bróm, 2-nitro, 1, 3 propandiol), je připraven ve vzorkovnicích (microtabs DF Control Systems) s koncentrací účinné látky ve vzorku od 0,2 do 0,4 %, u všech vzorků stejně (tableta na 25 až 50 ml mléka). Činidlo musí být šetrným mícháním rozpuštěno – mírné překlápění vzorkovnic. Efekt konzervace je eliminován v kalibraci stejným použitím konzervačního činidla pro měření rutinních vzorků mléka.

- Vzorky se vychladí na 6 až 8 °C (cca 3 až 6 hodin), 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, mechanické namáhání a možnost evaporace tak těkavé látky, jako je aceton (malé vzduchové prostory nad hladinou vzorku). Bylo doloženo experimentálně, podle časového transportního gradientu teplotní křivky, že praktikovaný systém přepravy je použitelný (SOJKOVÁ et al., 2009).

- Po analýze a validaci jsou výsledky deklarovány rozeslaným protokolem do rutinních laboratoří, elektronickou poštou ve formě oficiální tabulky.

## 8) Vlastní kalibrace rutinních infraanalýzátorů

- Vlastní kalibrace přístrojů MIR-FT na měření koncentrace acetonu v mléce na principu základního modelu lineární regrese analýzy signálů očištěných od interferenčních efektů při simultánní zpravidla multikomponentní analýze proběhne podle příslušných návodů výrobců zařízení, případně specifických standardních operačních postupů. Při kalibraci nelze referenční vzorky neúměrně namáhat s ohledem na čas, teplotu, míchání a riziko evaporace acetonu. Kalibraci je třeba pečlivě technicky připravit.

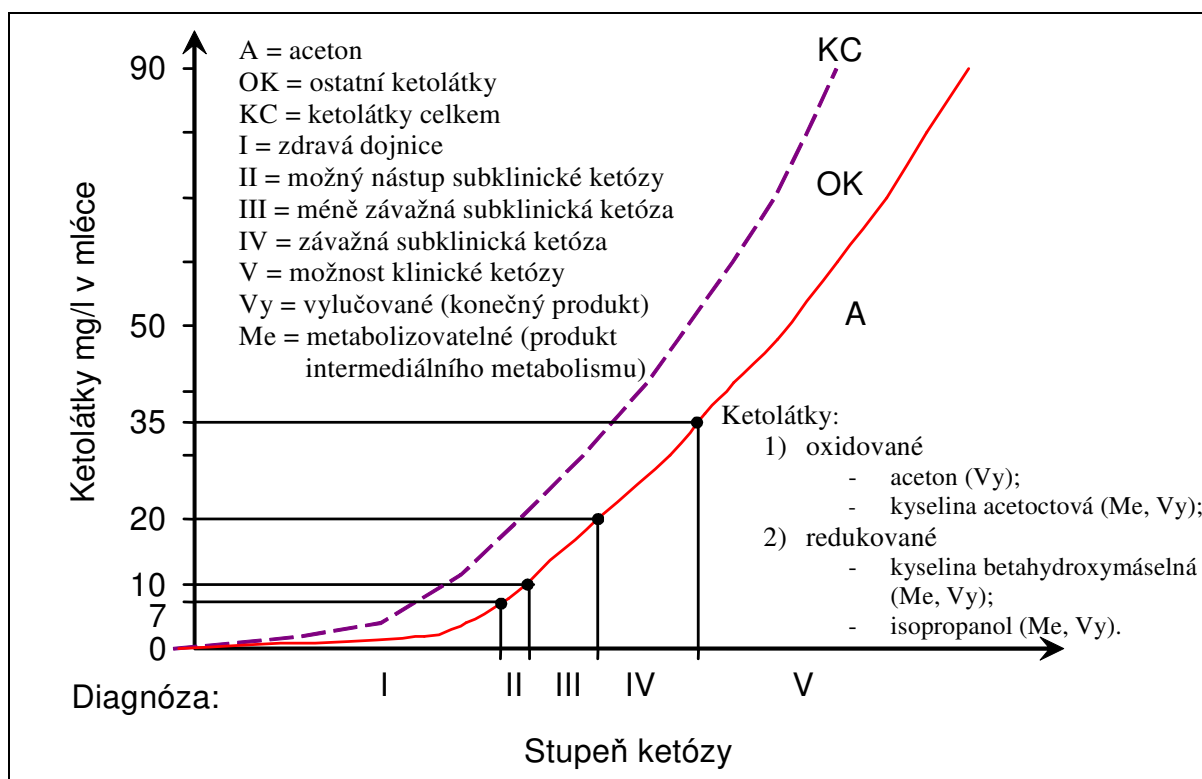
- Výsledky provedených modelových centrálních kalibrací ukázaly, že validační korelační koeficient provedené kalibrace mezi výsledky metody referenční a nepřímé pro monitorovací účely při měření by mohl činit metodou kvalifikovaného odhadu cca 0,75.

- Použitá norma ČSN 57 0536, 1999: Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem. Determination of milk composition by mid-infrared analyzer. (In Czech) Český normalizační institut, Praha.

## 9) Interpretace výsledků acetonu pro praktické možnosti kontroly zdraví zvířat a kvality resp. technologické způsobilosti syrového mléka

Aceton může být využit jako ukazatel energetického metabolismu dojníc. Interpretace je zobrazena graficky (Obr. 7) a odstupňována tabulkově (Tab. 1) do možných preventivních opatření.

Obr. 7 Graf dynamiky ketózy u zvířete - schéma nelineárního vzrůstu koncentrace acetonu (ketolátek) v mléce (případně tělních tekutinách) přežvýkavců se stupněm ketózy.



Existující variabilita obsahu acetonu v mléce samozřejmě není určována pouze stavem energetické bilance organismu krav, i když tento vliv je pravděpodobně nejvýznamnější. Existovaly alimentárně podmíněné vyšší zimní sezónní hladiny ketonových látek oproti letním v důsledku zkrmování větších dávek ketogenních krmiv, zejména méně kvalitních siláží (RAURAMAA a RAJAMÄKI, 1988; KVÍZ a HOFMAN, 1990). HANUŠ et al. (1993) zaznamenali např. v netradičním sledování obsahů acetonu v bazénových vzorcích mléka významný rozdíl v zimních a letních hladinách ( $5,8 \pm 4,7 > 4,4 \pm 2,4$  mg/l;  $P < 0,001$ ;  $n = 134$  a 224). Pohyb dojnic na pastvě a ve volném ustájení zřejmě vede k lepšímu metabolismu a odbourávání tuků i ketonových látek, případně lepší exkreci acetonu, takže problémy s výskytem ketóz a vyšších hladin ketonů resp. acetonu v mléce jsou za těchto technologických okolností nižší. Pokud se jedná o mezidruhové rozdíly mezi kravami a malými přežvýkavci, byly koncentrace acetonu v mléce převážně statisticky významně rozdílné. U krav byly průměrné zjištěné hodnoty od 2,03 do 6,10, u malých přežvýkavců poněkud vyšší od 6,10 (kozy) do 11,10 mg/l (ovce). U všech druhů je variabilita původních hodnot poměrně vysoká a pohybovala se od 53,7 % (u krav, Holštýn) přes 65,3 a 68,2 % (krávy České strakaté a ovce Cigája) do 105,5 % (kozy, Bílá krátkosrstá) za konkrétních podmínek sledování (GENČUROVÁ et al., 2008).

Tab. 1 Rámcová tabulka možné interpretace ketonů v mléce do praxe - interpretační schéma problému subklinických ketóz

Diagnostické indikační hodnoty acetonu v mléce (mg/l):

konzervované objemné krmivo (zimní, případně i letní sezóna) -	< 7	7 až 10	> 10 až 20	> 20 až 35	> 35
zelený pás krmení (letní sezóna) -	< 5	5 až 8	> 8 až 15	> 15 až 30	> 30

Interpretace:

Diagnóza	zdravá dojnice	možný nástup subklinické ketózy	méně závažná subklinická ketóza	závažná subklinická ketóza	možnost klinické ketózy
rizika přímá i nepřímá	—	vznik ketózy	zhoršení plodnosti	zhoršení plodnosti a dojivosti, posunutí slezu, acidóza, jaterní steatóza, imunosuprese a mastitidy	zhoršení plodnosti, dojivosti i kvality mléka, posunutí slezu, acidóza, jaterní steatóza, imunosuprese a mastitidy
průvodní jevy a příznaky	—	—	snížení příjmu krmiva, zvýšení tuku v mléce, ztráta kondice	snížení příjmu krmiva, zvýšení tuku v mléce, ztráta kondice	snížení příjmu krmiva, pokles dojivosti, zvýšení tuku v mléce, větší ztráta kondice
klinické příznaky					zvíře uléhá, trpí nechutenstvím, ubývá na hmotnosti, je dehydratované, srst ztrácí lesk, pach dechu po acetonu, zvíře může v těžších případech i uhynout

Rámcová preventivní a léčebná opatření:

—	preventivně zabránit ztučnění před porodem	preventivně zabránit ztučnění před porodem, zvýšení přívodu energie v krmení, preventivní zkrmení propylenglykolu	preventivně zabránit ztučnění před porodem, léčebné podání propylenglykolu, použití hepatoprotektivních preparátů	preventivně zabránit ztučnění před porodem, léčebné podání propylenglykolu, použití hepatoprotektivních preparátů	preventivně zabránit ztučnění před porodem, léčebné podání propylenglykolu, použití hepatoprotektivních preparátů, léčebná nitrožilní a podkožní aplikace glukózy a inzulinu, atp.
---	--	---	---	---	--

Názory na kritickou diskriminační hodnotu obsahu acetonu v mléce, resp. limit pro určení subklinické ketózy se značně různí od 4 do 40 mg/l (EMERY et al., 1964; UNGLAUB, 1983; ANDERSSON a EMANUELSON, 1985; GRAVERT et al., 1986; VOJTÍŠEK, 1986; KVÍZ a HOFMAN, 1990; GUSTAFSSON a EMANUELSON, 1993; HANUŠ, 1994). Obě mezní hodnoty se však jeví být přehnané. Horní nad-, resp. dolní podhodnocena. Na základě předchozích praktických zkušeností a vlastních experimentálních výsledků (HANUŠ, 1994; HLÁSNÝ, 1995; HANUŠ et al., 1999) lze považovat za diskriminační hladiny pro odhad subklinické ketózy přibližně následující limity: Ketophan (ketony v moči) >3+ (>7,5 mmol/l); Ketotest (ketony v mléce) >2+ (>15 mg/l); aceton v mléce >10 mg/l. I když v případě semikvantitativních testů nemohou být používané hranice zcela ostré, v praxi vyhovují zamýšlenému účelu.

Vzhledem k charakteru průběhu ketózního onemocnění dojníc a vzhledem ke skutečnosti, že subklinické formy (bez zjevných příznaků) jsou ekonomicky nebezpečnější (vyšší frekvence výskytu a nepozorovatelnost) než klinické (se zjevnými příznaky u zvířat) je důležitá včasná

diagnostika onemocnění. Ketóza a vyšší hladiny ketonů zhoršují reprodukci krav. Indikační schopnosti metod stanovení ketonů lze vhodně využít k monitoringu ketóz ve stádě a k zavádění protiketózních opatření (EMERY et al., 1964; JAGOŠ et al., 1981; KOLOUCH et al., 1991; VOJTÍŠEK et al., 1991; ILLEK a PECHOVÁ, 1997, 1998) jak preventivních (v případě náznaku subklinických stavů, prostřednictvím operativních změn ve výživě dojníc, aplikace ostropestřece mariánského, propylenglykolu atp.) tak terapeutických (v případě záchytu závažnějších subklinických nebo klinických stavů, kdy jsou již patrné zevní příznaky na zvířeti, aplikace glukózy, inzulinu atp., SAKAI et al., 1993). Je důležité vést o výsledcích monitoringu ketóz a provedených opatření včetně jejich účinnosti pravidelné záznamy.

VOJTÍŠEK et al. (1991) zkrmovali v peripartálním období (2 týdny) kravám ke krmné dávce 0,3 kg šrotu/den Ostropestřece mariánského se známými hepatoprotektivními účinky obsaženého silymarinového komplexu (KOLOUCH et al., 1991). Zaznamenali v tomto experimentu pokles stupně ketonurie krav a pokles acetonu a kyseliny octové v krvi a mléce pokusných krav oproti kontrolním, včetně zvýšení jejich mléčné produkce. Podobně zdokumentovali GREEN et al. (1999) příznivý účinek aplikace kapsulí Monensinu (uvolňujících  $335 \pm 33$  mg/den) v podobě redukce hladiny beta-hydroxybutyrátu v krvi (o 35 %), současného vzrůstu koncentrace glukózy v krvi (o 15 %) a tím omezení uměle indukovaného ketózního stavu dojníc.

Prevence je tedy efektivnější cestou eliminace výskytu ketóz než léčba. Součástí prevence je monitoring stavu dojníc po otelení, ke kterému slouží právě stanovení koncentrace ketolátek nebo acetonu v tělních tekutinách. Vhodné je zejména mléko ve smyslu odběru vzorků. Ketózu lze kontrolovat rovněž vyšetřením vzorků moči jako tzv. ketonurii. Tento přístup je však z hlediska způsobu odběru vzorku řazen do metod invazivního monitoringu, který je profesionálně náročnější. Analýza vzorků mléka je označována jako neinvazivní monitoring, který je bez problémů chovateli kdykoliv dostupný. To je výhoda oproti ostatním tělním tekutinám. Taková cesta je pak neriziková, levnější a umožňuje četné kombinace a další výhody.

Pomocí mléčných ketotestů pozorovali GEISHAUSER et al. (1997, 1998) souvislost mezi zvýšeným výskytem ketóz (resp. vyšších hladin ketonů v krvi) a korespondujícím vyšším výskytem levostranné dislokace slezu. Toto obtížně diagnostikovatelné produkční onemocnění je zpravidla způsobováno dietetickými faktory, zejména při značných dávkách jaderného krmiva v souvislosti s vysokou mléčnou užitkovostí. Pravděpodobně z uvedeného důvodu může být nejvyšší frekvence výskytu pozorována u dojníc plemene Holštýn. Náprava úpravou diety je nejistá, operativní zákrok v praxi obtížný a hrozí současně i riziko úhynu zvířete. Podle uvedených výsledků je zřejmé, že prevence zaměřená na omezení výskytu ketóz je i zároveň prevencí proti riziku tohoto onemocnění.

Sporadicky byla uvedena dědivost obsahů acetonu v mléce (BRANDT et al., 1985; GRAVERT et al., 1986) na úrovni 0,09 až 0,17, tedy poměrně nízká. Rovněž heritabilita hyperketonémie (EMANUELSON a ANDERSSON, 1986) byla podobná (3 až 7 %). Totéž platí pro klinickou ketózu, 9 a 7 % (MÄNTYSAARI et al., 1991). Proto byla doporučena další šetření (GRAVERT et al., 1986). DIEKMANN (1987) dále doporučil využívat v budoucnu obsahu acetonu v mléce dojníc na počátku laktace, kromě zjišťování deficitu energie, také jako nepřímého ukazatele ke šlechtění skotu na schopnost příjmu krmiv. Důvodem bylo, že zjistil významné negativní korelace (-0,42) mezi příjmem energie a obsahem acetonu v mléce v počátku laktace a významné pozitivní korelace (0,29 až 0,49) mezi deficitem energie a obsahem acetonu v mléce. Uvedené vysvětlilo 40 % variací v negativní energetické bilanci. Dojnice s vysokým

obsahem acetonu v mléce trpěly v postpartálním období až dvanáctitýdenní negativní energetickou bilancí, zatímco dojnice s nízkým obsahem acetonu pouze pětitydenní.

Vyšší hodnoty acetonu v mléce byly prezentovány pro stáda s vyšší dojivostí u plemene České strakaté, což se nepotvrdilo u plemene Holštýn v České republice ( $2,10 > 1,38$  a  $1,45 < 1,95$  mg/l; JANŮ et al., 2007 a HANUŠ et al., 2007). Podle posledních ještě nepublikovaných výsledků (HANUŠ et al., 2008) jsou pro ekologické farmaření typické vyšší hodnoty acetonu v mléce krav ve srovnání s chovy konvenčními ( $6,8 > 1,6$  mg/l) a ukázaly tak na trvalý energetický nedostatek ve výživě ekologických stád. Uvedené může mít význam zejména při zpřesnění interpretace výsledků složení mléka a koncentrace ketonů v mléce při praktické aplikaci měření v rutinní kontrole mléčné užitkovosti. Pokud se týká mléka malých přežvýkavců, podobný trend vztahu byl potvrzen u ovcí, ale nikoliv u koz (HANUŠ et al., 2008).

Rizikovitost zvýšených hladin ketonů v mléce platí i pro jeho kvalitu jako potravinářské suroviny. Kvalita mléka od dojnic s metabolickými problémy je zhoršena. V subklinických případech takové mléko nelze ve stáji z dodávky rutinně vyřazovat narozdíl od subklinických mastitid. Bez této možnosti eliminace se dostává do mlékárny. Zde může metabolicky zatížené mléko ohrožovat kvalitu průběhu mlékárenských technologií. Korelace acetonu k jogurtovému testu činila  $-0,21$  (HANUŠ et al., 1993). Byla však spíše dána souběžně změněnými ostatními vlastnostmi mléka, než samotnou zvýšenou koncentrací acetonu.

## **10) Závěr certifikované metodiky**

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 dojnic. Důležité jsou také složky minoritní, metabolity s úzkou vazbou na výživový stav dojnic: kyselina citrónová; močovina; volné mastné kyseliny; ketony. Mléko, na rozdíl od krve nebo moče, zajišťuje snadný odběr vzorků. Kvalita analytických výsledků rozhoduje o správnosti jejich praktické interpretace. Cílem bylo vyhodnotit některé referenční a rutinní postupy (MIR-FT, infračervená technologie celého spektra interferometrem s použitím Fourierových transformací) stanovení acetonu pro praktické použití. Výsledky uvádějí možné postupy včetně jejich validace.

Certifikovaná uplatněná metodika je zaměřena na objasnění provádění: postupu přípravy referenční sady vzorků; postupu kalibrace nepřímé instrumentální metody MIR-FT pro analýzy koncentrace acetonu mléka; validace metody MIR-FT pro určení acetonu. Certifikovaná uplatněná metodika podává informace o konkrétním návrhu a metodě efektivnějšího a efektnějšího postupu řízení a kontroly analytické práce v mlékařství. Jsou popsány interpretace k navrženým postupům i dosaženým výsledkům.

Popsaný postup a vyhodnocené výsledky doložené v přílohách, o které se postup v zásadě opírá, poskytují možnost technicky uplatnit nově ověřenou metodu analýzy důležité minoritní složky mléka, acetonu, na principu centrální kalibrace a možnost zlepšení monitoringu zdravotního stavu dojnic (ketóz a reprodukce) a kvality mléka pro podporu kvality mléčného potravinového řetězce.

### **III) Srovnání „novosti postupů“ a předání certifikované metodiky: Příprava referenčních vzorků a posouzení kvality kalibrace pro stanovení ketonů jako acetonu metodou infračervené spektroskopie FT v mléčných laboratořích:**

- 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 kalibrace a měření a rozšíření spektra stanovovaných analytů v laboratořích kontroly 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 adjustaci a validaci měření ketonů (acetonu) 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, 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 syrového mléka a zdraví dojníc a pro zvýšení věrohodnosti výsledků;
- 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 a reprodukce) stavu dojníc, prevenční práce s ohledem na rizika v chovu dojeného skotu a poradenství ke kvalitě mléka. Zlepšením kvality výsledků zde může tvořit podíl do 6 % 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 i 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 20 tis. Kč ročně (předpokládané poplatky za provedení referenčních prací dvakrát ročně). Činnost se periodicky aktualizuje. Přínos pro uživatele (laboratoře) v podobě tržeb za provedené rutinní analýzy (odhad 3 000 analýz individuálních vzorků měsíčně krát 12 činí 36 000 analýz krát 15 Kč za selektivní analýzu (ve smyslu výběru vzorků) je 540 000 Kč ročně. Efekt je opakovatelný po rocích.

## VI) Seznam použité související literatury

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

- ANDERSSON, L.: Concentrations of blood and milk ketone bodies, blood isopropanol and plasma glucose in dairy cows in relation to the degree of hyperketonaemia and clinical signs. *Zbl. Vet. Med.*, A 31, 1984, 683-693.
- ANDERSSON, L.: Subclinical ketosis in dairy cows. *Veterinary Clinical of North America: Food Animal Practice*, 4, 2, 1988, 233-251.
- ANDERSSON, L.- EMANUELSON, U.: An epidemiological study of hyperketonaemia in Swedish dairy cows: determinants and the relation to fertility. *Prev. Vet. Med.*, 3, 1985, 449.
- ANDERSSON, L.- LUNDSTRÖM, K.: Milk and blood ketone bodies, blood isopropanol and plasma glucose in dairy cows, methodical studies and diurnal variations. *Zbl. Vet. Med.*, 31, 1984 a, 340-349.
- ANDERSSON, L.- LUNDSTRÖM, K.: Effect of energy balance on plasma glucose and ketone bodies in blood and milk and influence of hyperketonaemia on milk production of postparturient dairy cows. *Zbl. Vet. Med.*, 31, 1984 b, 539-547.
- BRANDT, A.- PABST, R.- SCHULTE-COERNE, H.- GRAVERT, H.O.: Die Heritabilität der Futteraufnahme bei Milchkühen. *Züchtungskunde*, 57, 1985, 299-308.
- CARRIER, J.- STEWART, S.- GODDEN, S.- FETROW, J.- RAPNICKI, P.: Evaluation and use of three cow-side tests for detection of subclinical ketosis in early postpartum cows. *J. Dairy Sci.*, 87, 2004, 3725-3735.
- DIEKMANN, L.: Energiebilanz vor und nach dem Kalben. *Tierzüchter*, 2, 1987, 72-73.
- EMANUELSON, U.- ANDERSSON, L.: Genetic variation in milk acetone in Swedish dairy cows. *J. Vet. Med.*, A 33, 1986, 600-608.
- EMERY, R. S.- BURG, N.- BROWN, L. D.: Detection, occurrence and prophylactic treatment of borderline ketosis with propylene glycol feeding. *J. Dairy Sci.*, 47, 1964, 1074.
- FAMIGLI-BERGAMINI, P.: Rapporti tra patologia (non mammaria) ed aspetti quali-quantitativi del latte nella bovina. *Società Italiana di Buiatria, Bologna*, 19, 8-10, 1987, 89-99.
- ENJALBERT, F.- NICOT, M. C.- BAYOURTHE, C.- MONCOULON, R.: Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *J. Dairy Sci.*, 84, 2001, 583-589.
- FÜLL, M.- DECKERT, W.- SCHÄFER, M.- WEHLITZ, A.: Lipolyse und Ketogenese bei Milchkühen - Beobachtungen im Laktationsverlauf. *Mh. Vet.-Med.*, 47, 1992, 119-124.
- GASTEINER, J.: Ketose, die bedeutendste Stoffwechselerkrankung der Milchkühe. In: *BAL Gumpenstein Bericht*, 27. Viehwirtschaftliche Fachtagung, Juni, 2000, 11-18.
- GASTEINER, J.: Der Einsatz glukoplastischer Verbindungen in der Milchviehfütterung. In: *BAL Gumpenstein Bericht*, 30. Viehwirtschaftliche Fachtagung, April, 2003, 61-63.
- GEISHAUSER, T.- LESLIE, K. E.- DUFFIELD, T.- EDGE, V.: An evaluation of milk ketone tests for the prediction of left displaced abomasum in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 80, 1997, 3188-3192.
- GEISHAUSER, T.- LESLIE, K. E. - DUFFIELD, T.- SANDALS, D.- EDGE, V.: The association between selected metabolic parameters and left abomasal displacement in dairy cows. *J. Vet. Med.*, A 45, 1998, 499-511.
- GRAVERT, H. O.- LANGER, R.- DIEKMANN, L.- PABST, K.- SCHULTE-COERNE, H.: Ketonkörper in Milch als Indikatoren für die Energiebilanz der Milchkühe. *Züchtungskunde*, 58, 1986, 309-318.

- GRAVERT, H. O.- JENSEN, E.- HEFAZIAN, H.- PABST, K.- SCHULTE-COERNE, H.: Umweltbedingte und genetische Einflüsse auf den Acetongehalt der Milch. *Züchtungskunde*, 63, 1, 1991, 42-50.
- GREEN, B. L.- MC BRIDGE, B. W.- SANDALS, D.- LESLIE, K. E.- BAGG, R.- DICK, P.: The impact of a Monensin controlled - release capsule on subclinical ketosis in the transition dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 83, 1999, 333-342.
- GUSTAFSSON, A. H.- EMANUELSON, U.: Milk acetone as indicator of hyperketonaemia in dairy cows - the critical value revised. *EAAP Congr. Aarhus, Denmark, 1993*, 443.
- HAMANN, J.- FEHLINGS, K.: Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Herdenproblem. *DVG, Kiel, 1994*.
- HANSEN, P. W.: Screening of dairy cows for ketosis by use of infrared spectroscopy and multivariate calibration. *J. Dairy Sci.*, 82, 1999, 2005-2010.
- HARASZTI, J.- ZÖLDAG, L.: Die diagnostische Rolle der Ketonurie in der Vorhersage von Fortpflanzungsstörungen der Kühe. *Wien Tierärztl. Mschr.*, 77, 1990, 377-380.
- HEUER, C.- LUNGE, H. J.- LUTZ, E. T. G.- SCHUKKEN, Y. H.- VAN DER MAAS, J. H.- WILMINK, H.- NOORDHUIZEN, J. P. T. M.: Determination of acetone in cow milk by Fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. *J. Dairy Sci.*, 84, 2000, 575-582.
- HEYDER, J.: Acetona pomáha našim chovateľom dosahovať vysokú produkciu mlieka pri zachovaní zdravia dojníc. Acetona helps our breeders to reach the high milk yield at good health of dairy cows. *Slovenský Chov*, 6, 1998, 31.
- ILLEK, J.- PECHOVÁ, A.: Poruchy metabolismu dojníc a kvalita mléka. *Metabolic disorders at cows and milk quality. Farmář*, 6, 1997, 29-30.
- JÍLEK, M.: osobní sdělení, 1999 a 2008.
- HLÁSŇÝ, J.: Systém v diagnostice a prevenci poruch metabolismu bílkovin a energie u dojníc při zvyšování užitkovosti i reprodukce. A system at diagnosis and prevention of protein and energy metabolic disorders of dairy cows at increasing of milk yield and reproduction. *Výzkum v chovu skotu*, 4, 1997, 11-21.
- KAUPPINEN, K.: Prevalence of bovine ketosis in relation to number and stage of lactation. *Acta vet. scand.*, 24, 1983, 349-361.
- KAUPPINEN, K.: Annual milk yield and reproductive performance of ketotic and non-ketotic dairy cows. *Zbl. Vet. Med.*, A 31, 1984, 694-704.
- KNEGSEL, VAN A. T. M.- DRIFT, VAN DER S. G. A.- HORNEMAN, M.- ROOS, DE A. P. V.- KEMP, B.- GRAAT, G. A. M.: Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 93, 2010, 3065-3069.
- KOLOUCH, F.- ČECHOVÁ, I.- REŽNICKÝ, M.- PAULOVÁ, J.: Morfologické změny při poporodní steatóze jater vysokoproduktivních dojníc ovlivněné aplikací silymarinu. The morphological changes at post-partum liver steatosis at high milk yield cows effected by administration of silymarine. *Veterinářství*, 41, 1991, 1-2, 7-9.
- KVÍZ, J.- HOFMAN, J.: Metabolický profil dojnice a analýza vzorku mléka. *Metabolic profile of dairy cow and milk sample analysis. Náš chov*, 8, 1990, 364-373.
- LESLIE, K. E.: dopisní sdělení. Letter brief communication. 1999.
- MAJEWSKA, B.- RYBCZYŃSKA, J.: Oznaczenie ciał ketonowych w postaci acetonu w osoczu, siarce i mleku u bydla. *Medycyna Weterynaryjna*, 7, 1978, 439-441.
- MÄNTYSAARI, E. A.- GRÖHN, Y. T.- QUAAS, R. L.: Clinical ketosis: Phenotypic and genetic correlations between occurrences and with milk yield. *J. Dairy Sci.*, 74, 1991, 3985-3993.
- MELOUN, M.- MILITKÝ, J.: Statistical processing of experimental data by personal computer. (In Czech) *Díl IIA, Pardubice, 1992*, 102.

- MELOUN, M.- MILITKÝ, J.: Statistical processing of experimental data. (In Czech) Plus, ISBN 80-85297-56-6, 1994, 839
- MIETTINEN, P. V. A.: Relationship between milk acetone and milk yield in individual cows. *J. Vet. Med.*, A 41, 1994, 102-109.
- MIETTINEN, P. V. A.: Prevention of bovine ketosis with glucogenic substance and its effect on fertility in Finnish dairy cows. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 108, 1995, 14-19.
- MOTTRAM, T.: Review: Non - invasive monitoring of the metabolic and health status of dairy cows. EAAP, 47th Annual Meeting, Lillehammer, 1996, 124.
- MOTTRAM, T.- MASSON, L.: Dumb animals and smart machines: the implication of modern milking systems for integrated management of dairy cows. In: Integrated management system for livestock, occasional Publication 28, British Society of Animal Science, 2001, 77-84.
- MOTTRAM, T.- VELASCO-GARCIA, M.- BERRY, P.- RICHARDS, P.- GHESQUIERE, J.- MASSON, L.: Automatic on-line analysis of milk constituents (urea, ketones, enzymes and hormones) using biosensors. *Comp. Clin. Pathol.*, 11, 2002, 50-58.
- O'MOORE, L. B.: A quantitative diffusion method for the detection of acetone in milk. *Vet. Rec.*, 31, 1949, 457-458.
- PARKER, R.: Using body conditions scoring in dairy herd management. Factsheet, MAF Ontario, 1989.
- RAURAMAA, A.- RAJAMÄKI, S.: Urea and ketone bodies in milk during outdoor and indoor feeding periods. WAAP, Helsinki, 1988, 8, 711.
- ROOS DE, A. P. W.- BIJGAART VAN DEN, H. J. C. M.- HORLYK, L.- JONG DE, G.: Screening for subclinical ketosis in dairy cattle by Fourier transform infrared spectrometry. Final programme and Technical presentations, 35th ICAR Session, Kuopio, Finland, 3rd – 10th June 2006, 2006, 53-59.
- SAKAI, T.- HAYAKAWA, T.- HAMAKAWA, M.- OGURA, K.- KUBO, S.: Therapeutic effects of simultaneous use of glucose and insulin in ketotic dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 76, 1993, 109-114.
- STEGER, H.- GIRSCHEWSKI, H.- PIATKOWSKI, B.: Die Beurteilung des Ketosisstatus laktierender Rinder aus der Konzentration der Ketokörper im Blut und des Azetons in der Milch. *Arch. Tierernähr.*, 22, 1972, 157-162.
- UNGLAUB, W.: Untersuchung zur Bestimmung und zum Gehalt des Azeton in Milch. *Tierärztl. Umsch.*, 1983, 534-543.
- VOJTÍŠEK, B.: The determination of acetone in milk, colostrum, blood and urine of dairy cows by microdiffusion method. (In Czech) *Veterinářství*, 36, 1986, 9, 394-396.
- VOJTÍŠEK, B.- HRONOVÁ, B.- HAMŘÍK, J.- JANKOVÁ, B.: Milk thistle (*Silybum marianum*) in feed rations administered to ketotic cows. (In Czech) *Veter. Med. (Praha)*, 36, 6, 1991, 321-330.
- WALDMANN, A.- REKSEN, O.- LANDSVERK, K.- KOMMISRUUD, E.- ROPSTAD, E.: Relationship between milk acetone at first insemination and reproductive performance and fertility of Norwegian cattle. ESDAR, Dublin, 5.-6. září, 2003.
- WOOD, G. M.- BOETTCHER, D. F.- KELTON, D. F.- JANSEN, G. B.: Phenotypic and genetic influences on test-day measures of acetone concentration in milk. *J. Dairy Sci.*, 87, 2004, 1108-1114.

## VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

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

- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- HULOVÁ, I.- VYLETĚLOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.: The differences of selected indicators of raw milk composition and properties between small ruminants and cows in the Czech Republic. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, L, 183, 3, 2008, ISSN 0139-7265, 10-19.
- HANUŠ, O.: Aktuální otázky praxe k výskytu inhibičních látek, „nežádoucích metabolitů“ a zdraví mléčné žlázy. A present-day questions to the occurrence of inhibitory substances, „unrequested metabolites“ and health condition of mammary gland from the practice. *Výzkum v chovu skotu*, XXXVI, 1994, 3, 25-41.
- HANUŠ, O.: Možnosti praktických interpretací mléčného obrazu. A possibilities of milk pattern interpretations in practice. *Výzkum v chovu skotu*, 4, 1998, 1-5.
- 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.- BJELKA, M.: Studie genetické diverzity některých ukazatelů laktace dojnic. Study of genetic diversity in some parameters characterizing dairy cow lactation. XVIII Genetické dny, 1998, 169.
- HANUŠ, O.- BJELKA, M.- TICHÁČEK, A.- JEDELSKÁ, R., KOPECKÝ, J.: Analýza nezbytnosti a účelnosti transformací dat u souborů výsledků některých mléčných parametrů. Substantiation and usefulness of transformations in data sets of analyzed milk parameters. In *Chov a šlechtění skotu pro konkurenceschopnou výrobu: sborník referátů VÚCHS Rapotín*, In Rearing and breeding of cattle for competitionable production: proceedings of the seminar VÚCHS Rapotín, 2001 a, 122-135.
- HANUŠ, O.- ČERNÝ, V.- FRELICH, J.- BJELKA, M.- POZDÍŠEK, J.- NEDĚLNÍK, J.- VYLETĚLOVÁ, M.: The effects of over sea height of locality on some chemical, health, microbiological, physical and technological parameters of cow milk and sensorical properties of cheeses. (In Czech) *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LIII, 2, 2005, 19-32.
- 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, ISSN 1801-7576, 563-571.
- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- ROUBAL, P.- VORLÍČEK, Z.- ŘÍHA, J.- POZDÍŠEK, J.- BJELKA, M.: Dairy cow breed impacts on some chemical-compositional, physical, health and technological milk parameters. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research XLV*, 4, 2003, 1-10.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- PONÍŽIL, A.- HLÁSNÝ, K.- GABRIEL, B.- MÍČOVÁ, Z.: Vliv ročního období, přídávku močoviny, acetonu a dusičnanů a přirozeného obsahu mikroprvků na kysací schopnost kravského mléka. The effects of year season, urea, acetone and nitrate additions and native content of microelements on cow's milk fermentation. (In Czech) *Živoč. Výr. / Czech J. Anim. Sci.*, 38, 8, 1993 b, 753-762.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- LANDOVÁ, H.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: The comparison of relationships between milk indicators in different species of ruminants in the Czech Republic. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, L, 183, 3, 2008, ISSN 0139-7265, 35-44.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ZHANG, Y.- HERING, P.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- DOLÍNKOVÁ, A.- MOTYČKA, Z.: Milk acetone determination by the photometrical method after microdiffusion and via FT infra-red spectroscopy. Stanovení acetonu v mléce fotometricky po mikrodifúzi a pomocí infračervené spektroskopie FT. *Journal of Agrobiology*, 28, 1, ISSN 1803-4403, 2011 a, 33-48.

- HANUŠ, O.- HLÁSNÝ, J.- SKYVA J.- TRAJLINEK, J.: Ketózy, vážný problém vysoce dojných stád. *Náš chov*, 2002, 3, 27-29.
- HANUŠ, O.- HLÁSNÝ, J.- TRAJLÍNEK, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Výsledky vyšetření dojnic na subklinickou nebo klinickou ketózu (testování semikvantitativního diagnostika Ketotest – ketolátky v mléce). Results of dairy cows examination on subclinical or clinical ketosis (evaluation of semiquantitative diagnostic tool Ketotest – ketone bodies in milk. In *Nové trendy v organizačních, technologických a hygienických postupech nákupu syrového mléka v kontextu podmínek EU: sborník referátů OAK Šumperk*, In *New trends in organizational, technological and hygienical procedures of raw milk purchase in the context to EU conditions: proceedings of the seminar OAK Šumperk*, 2001 b, 88-90.
- HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- KOPECKÝ, J.: Konstrukce algoritmu pro efektivní sofistikované grafické vyhodnocování výsledků složení a kvality bazénových vzorků mléka. The algorithm construction for an effective and sophisticated evaluation of the results of the bulk milk sample composition and quality. *Výzkum v chovu skotu*, XLVIII, 175, ISSN 0139-7265, 3, 2006, 1-26.
- HANUŠ, O.- KUČERA, J.- YONG, T.- CHLÁDEK, G.- HOLÁSEK, R.- TRINÁCTÝ, J.- GENČUROVÁ, V.- SOJKOVÁ, K.: Effect of sires on wide scale of milk indicators in first calving Czech Fleckvieh cows. Vliv otců na širokou škálu mléčných ukazatelů u prvotelek Českého strakatého plemene. *Archiv Tierzucht / Archives Animal Breeding*, 54, 1, ISSN 003-9438, 2011 b, 36-50.
- HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- VYLETĚLOVÁ, M.- YONG, T.- BJELKA, M.- DUFEK, A.: The relations of some milk indicators of energy metabolism in cow, goat and sheep milk. Vztahy některých mléčných ukazatelů energetického metabolismu v kravském, kozím a ovčím mléce. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 42, 3, ISSN 1211-3174, 2011 c, 102-112.
- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.: Vztahy obsahů močoviny a acetonu v mléce k plodnosti a dlouhověkosti dojnic. Relationships of milk urea and acetone contents to fertility and longevity of dairy cows. *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, 2002, 2, 13-16.
- HANUŠ, O.- SKYVA, J.- FICNAR, J.- JÍLEK, M.- TICHÁČEK, A.- JEDELSKÁ, R.- DOLÍNKOVÁ, A.: Poznámky k interpretačním postupům hodnocení výsledků obsahů ketonů a acetonu (Ketotest) v individuálních vzorcích mléka. A notes to interpretation procedures of results ketone and acetone contents evaluation (Ketotest) in individual cow's milk samples. *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, 1999, 4, 17-34.
- HANUŠ, O.- TICHÁČEK, A.: Confrontation of variation in relations characterizing routine milk pattern and its preventive relevancy. 48th Annual Meeting of EAAP, 1997, Vienna, Austria.
- HANUŠ, O.- TRAJLINEK, J.- HLÁSNÝ, J.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Problematika ketóz, jejich diagnostiky a monitoringu. Ketosis problem, its diagnostic and monitoring. In *Chov a šlechtění skotu pro konkurenceschopnou výrobu: sborník referátů VÚCHS Rapotín*, In *Rearing and breeding of cattle for competitionable production: proceedings of the seminar VÚCHS Rapotín*, 2001 c, 105-113.
- HANUŠ, O.- YONG, T.- KUČERA, J.- GENČUROVÁ, V.- DUFEK, A.- HANUŠOVÁ, K.- KOPEC, T.: The predicative value and correlations of two milk indicators in monitoring energy metabolism of two breeds of dairy cows. Predikční hodnota a korelace dvou mléčných ukazatelů v monitoringu energetického metabolismu dvou plemen dojnic. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 42, 1, ISSN 1211-3174, 2011 d, 1-11.
- JANŮ, L.- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- MACEK, A.- ZAJÍČKOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.: Influences of different milk yields of Holstein cows on milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Vet. Brno*, 76, 4, 2007, ISSN 1801-7576, 553-561.

- ŘÍHA, J.- HANUŠ, O.: The relationships between individual reproduction parameters and milk composition in first 120 lactation days. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, XLI, 4, 1999, 3-17.
- ŘÍHA, J.- HANUŠ, O.: Problémy managementu reprodukce dojníc. Inform. zpr. pro vet. a zeměd. praxi, 4, 1998, 12-22.
- 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.
- 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 a, 21-28.
- SOJKOVÁ, K.- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- YONG, T.- HULOVÁ, I.- VYLETĚLOVÁ, 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 b, 84-91.
- ŠRÁMEK, J.- TICHÁČEK, A.- HANUŠ, O.- BEBER, K.- PINĎÁK, J.- KOPP, O.: Organizačně technické a ekonomické aspekty produkce mléka pro kojeneckou a dětskou výživu. Organization-technical and economical aspects of primary milk production for producing and processing of baby nutrition. VÚCHS Rapotín report, Czech Republic, 1992.

Ne všechny práce ze seznamu literatury (11, 12), 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 KONTAKT ME 09081 a aktivitami Národní referenční laboratoře pro syrové mléko Rapotín.***

### 13) Přílohové materiály s podklady pro vývoj certifikované metodiky

Přílohy této certifikované uplatněné metodiky (Příprava referenčních vzorků a posouzení kvality kalibrace pro stanovení ketonů jako acetonu 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

- 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, ISSN 1801-7576, 563-571.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ZHANG, Y.- HERING, P.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- DOLÍNKOVÁ, A.- MOTYČKA, Z.: Milk acetone determination by the photometrical method after microdiffusion and via FT infra-red spectroscopy. Stanovení acetonu v mléce fotometricky po mikrodifúzi a pomocí infračervené spektroskopie FT. *Journal of Agrobiology*, 28, 1, ISSN 1803-4403, 2011, 33-48.
- HANUŠ, O.- KUČERA, J.- YONG, T.- CHLÁDEK, G.- HOLÁSEK, R.- TŘINÁCTÝ, J.- GENČUROVÁ, V.- SOJKOVÁ, K.: Effect of sires on wide scale of milk indicators in first calving Czech Fleckvieh cows. Vliv otců na širokou škálu mléčných ukazatelů u prvotelek Českého strakatého plemene. *Archiv Tierzucht / Archives Animal Breeding*, 54, 1, ISSN 003-9438, 2011, 36-50.
- HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- VYLETĚLOVÁ, M.- YONG, T.- BJELKA, M.- DUFEK, A.: The relations of some milk indicators of energy metabolism in cow, goat and sheep milk. Vztahy některých mléčných ukazatelů energetického metabolismu v kravském, kozím a ovčím mléce. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 42, 3, ISSN 1211-3174, 2011, 102-112.
- HANUŠ, O.- YONG, T.- KUČERA, J.- GENČUROVÁ, V.- DUFEK, A.- HANUŠOVÁ, K.- KOPEC, T.: The predicative value and correlations of two milk indicators in monitoring energy metabolism of two breeds of dairy cows. Predikční hodnota a korelace dvou mléčných ukazatelů v monitoringu energetického metabolismu dvou plemen dojnic. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 42, 1, ISSN 1211-3174, 2011, 1-11.
- JANŮ, L.- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- MACEK, A.- ZAJÍČKOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.: Influences of different milk yields of Holstein cows on milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Vet. Brno*, 76, 4, 2007, ISSN 1801-7576, 553-561.