



Certifikovaná metodika QJ1510339 RO1417 CM 34 - název:

Systematická souhrnná zpráva energetického zdravotního stavu stáda dojnic – Ketosis Report

Certifikovaná uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému kontroly mléčné užitkovosti pro identifikaci subklinické ketózy krav, energetického stavu metabolismu dojnic ve stádě a podporu prevence ketóz, zdraví dojnic a kvality mléka.

I) Cíl certifikované uplatněné metodiky:

Cílem je efektivní rozšíření spektra interpretačních a poradenských postupů prováděných pravidelně a systémově podle výsledků analýz individuálních vzorků v kontrole mléčné užitkovosti za účelem prevence poruch energetického metabolismu a ketóz dojnic a podpory zdraví zvířat a následně kvality potravinové suroviny a provozní jistoty chovatelů.

Náplň certifikované uplatněné metodiky:

Náplň certifikované metodiky QJ1510339 RO1417 CM34 je implementace dosažených výsledků, získaných na základě předchozího výzkumu a vývoje v rámci řešení projektů MZe NAZV KUS QJ1510339 a RO1417 do prostředí rutinní kontroly mléčné užitkovosti (KU) a chovů dojnic v České republice pro podporu jejich zdravotního stavu a eliminaci ztrát na užitkovosti.

Zdroj certifikované uplatněné metodiky:

Projekty MZe NAZV KUS QJ1510339 a RO1417.

Zpracovali dne: 31. 8. 2017; Jan Říha¹, Oto Hanuš², Radoslava Jedelská², Petr Roubal², Růžena Seydlová², Marcela Klimešová², Jaroslav Kopecký²; ¹ Bentley Czech s.r.o., Praha; ² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha.

Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů metodiky od 22. 12. 2017.

II) Vlastní popis certifikované metodiky

Systematická souhrnná zpráva energetického zdravotního stavu stáda dojnic – Ketosis Report

Struktura certifikované metodiky:

1) Úvod a současný stav

A) Představení a implementace základních prvků systému QA (Quality Assurance) u chemických a fyzikálních metod v referenčních a rutinních laboratořích pro analýzy kvality syrového mléka

B) Podpora pozitivního vývoje kvality stanovení minoritních metabolicko-diagnostických složek mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT)

C) Mléko jako zdroj informací ke ketóze, zejména subklinické

D) Rozšíření analytického portfolia metody MIR-FT pro monitoring produkčních poruch dojnic a jeho pravděpodobnostní metody, Ketosis Report

2) Cíle certifikované metodiky Ketosis Report

3) Vlastní výzkum a vývoj pro certifikovanou metodiku – validace vybraných možností analytických metod a spolehlivosti indikačních dat (cut-off limits) o složení a vlastnostech kravského mléka v kontrole užítkovosti s ohledem na subklinickou ketózu

A) Stanovení acetonu v mléce fotometricky po mikrodifúzi a pomocí infračervené spektroskopie FT

B) Vývoj metod a postupů v nepřímém infračerveném určení acetonu v mléce

C) Predikční hodnota a korelace dvou mléčných ukazatelů v monitoringu energetického metabolismu dvou plemen dojnic

D) Analýza vztahů mezi některými mléčnými ukazateli energetického metabolismu krav a jejich ketózního stavu

E) Popis aplikačního protokolu Ketosis Report

4) Závěr certifikované metodiky

5) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky

6) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci certifikované metodiky

Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech

Předchozí tematicky relevantní certifikované metodiky k problematice alternativního provedení kontroly mléčné užítkovosti

7) Přílohové materiály s podklady pro vývojovou práci v rámci certifikované metodiky

Nejčastěji použité zkratky:

AC = aceton; B = bílkoviny; BHB = beta hydroxybutyrát; CF = České strakaté; H = Holštýn; HB = hrubé bílkoviny; KC = kselina citronová; KU = kontrola užítkovosti; L = laktóza; MIR-FT = technologie infraanalýzy mléka s celým spektrem pomocí Michelsonova interferometru a s využitím Fourierových transformací; NEB = negativní energetická bilance; SK = subklinická ketóza; T = tuk; T/B = F/CP = tuk/bílkoviny; T/L = F/L = tuk/laktóza

1) Úvod a současný stav

A) Představení a implementace základních prvků systému QA (Quality Assurance) u chemických a fyzikálních metod v referenčních a rutinních laboratořích pro analýzy kvality syrového mléka

Význam správnosti výsledků analýz syrového mléka

Věrohodnost výsledků referenčních a následně rutinních analýz složení a hygienické kvality mléka je nepochybně důležitá pro hospodářské účely. Jedná se o šlechtění zvířat a obchod s plemenným materiálem, stejně jako o poradenství k výživě a zdravotnímu stavu krav (individuální vzorky mléka v kontrole užitkovosti). Dále o řízení mlékařské technologie, proplácení kvality mléka a kvalitu mléčného potravinového řetězce (bazénové vzorky v kontrole kvality syrového mléka). Tato kvalita souvisí také s jeho bezpečností pro konzumenty. V praxi ovšem někdy vznikají z komerčního hlediska sporné situace ohledně věrohodnosti výsledků. Zde však objektivita techniky srovnávání případného výsledkového rozdílu nezřídka není zcela zajištěna. Proto a přesto se intenzivně pracuje na zlepšení dané otázky. Mléčné laboratoře se sjednocují a centralizují, což je výhodné pro uplatnění jednotných referenčních postupů a standardů. Spolupracují v sítích (GRAPPIN, 1993), sjednocují metodické postupy a zintenzivňuje se kontrola věrohodnosti (správnosti) výsledků. Relevantní mléčné laboratoře akreditovaly své postupy a ročně podléhají akreditačním auditům. Akreditované laboratoře zavedly systém kontroly jakosti, musí mít, jak známo, vypracovanou příručku jakosti a kontrolovatelný systém zajištění kvality výsledků analýz. To je celá řada objektivizujících kroků za posledních deset roků. Tím není ani zdaleka řečeno, že jsou zvládnuta všechna úskalí systému, nebo že výsledkové rozdíly nebudou existovat. Takový stav nemůže nastat ani teoreticky ani prakticky, rozdíly však mohou být minimalizovány.

Neexistence zlatého standardu v mlékařských analýzách

V oboru analýz syrového mléka, vzhledem k jeho možné biochemické variabilitě s ohledem na faktory biologického druhu, sezónní vlivy, efekty výživy, krmení a zdravotního stavu zvířat, neexistuje něco, co známe z jiných oborů a to je zlatý standard. Tento lze v jiných analytických oborech spolehlivě uchovávat nezměněný po dlouhou dobu a používat pro účely kalibrací nebo srovnávání k potvrzení správnosti výsledků analýz. Zmíněné patřičně komplikuje situaci v zajištění věrohodnosti výsledků analýz mléka. Navíc shora uvedené efekty přispívají k interferencím do vztahů mezi přímými (klasickými, referenčními, kalibračními) a nepřímými (rutinními, kalibrovanými) metodami mlékařských analýz (BIGGS et al., 1987; GRAPPIN, 1987, 1993; HANUŠ a FICNAR, 1990; GRAPPIN a LEFIER, 1993). Tato skutečnost situaci komplikuje ještě více. Proto musí být rutinní metody pravidelně kalibrovány. Situaci v tomto oboru z mezinárodního pohledu koordinuje více profesních organizací jako IDF, ICAR, AFEMA atp. Pracovní analytické skupiny se zabývají výzkumem a vývojem mlékařských analytických postupů, řešením sporných metodických otázek a organizací výkonnostních testů analytické způsobilosti, zejména pro referenční postupy.

Kontrola kvality referenčních i rutinních výsledků chemických analýz v mlékařství ke kalibracím a ve výkonnostních testech v ČR

Akreditovaná národní referenční laboratoř pro syrové mléko (NRL-SM) je pro kontrolu svých výsledků napojena svými referenčními metodami na mezinárodní výkonnostní testy APLAC (sušené mléko, chemické zkoušky), ICAR-CECALAIT (syrové mléko, chemické a mikrobiologické zkoušky; od 1996; HANUŠ et al., 2000), AFEMA (syrové mléko,

chemické zkoušky; od 2006), QM (mléko, mikrobiologické zkoušky) a na národní testy ASLAB (analýzy vod, chemické a mikrobiologické). V mlékařství jsou uznávány další významné testy jako MUVA Kempten (složky mléka) nebo BAM Kiel (počet somatických buněk). Z titulu své funkce pak NRL-SM sama organizuje a provádí přípravu a pravidelné rozesílání sad referenčních standardů (obsah tuku (T), hrubých bílkovin (HB), kaseinu (K), monohydrátu laktózy (L), sušiny tukuprosté (STP) a koncentrace kyseliny citronové (C)) pro kalibrace nepřímých mlékařských metod (převážně infraanalýza) a dále výkonnostní testování na národní úrovni (T, HB, L, koncentrace močoviny (M), bod mrznutí mléka (BMM)). Kalibrace jsou prováděny v měsíčních intervalech, což bylo odvozeno na základě výzkumně-vývojových a praktických zkušeností (HANUŠ et al., 2005, 2006). Výkonnostní testy pak měsíčně pro T, HB, L a čtvrtletně pro M a BMM. V našem systému, resp. pracovní síti v ČR, tak existují referenční (REL) laboratoř (přímé metody) a rutinní (RUL) laboratoře (nepřímé metody). Pochopitelně, pro jednotlivé zkoušky mohou být jiné REL. Jak kalibrace, tak výkonnostní testy (pro T, HB, L, K, STP, C, M, i BMM) jsou NRL-SM konvenčně prováděny na škále desíti vzorků mléka s relevantními variačními obory. Výjimkou je pouze výkonnostní test pro BMM, který je kromě desíti mléčných vzorků souběžně prováděn také na dvou vodných roztocích NaCl. Zmíněné variační obory referenčních nebo kontrolních sad vzorků jsou přibližně: T 2 až 3 % (od 2 do 5 %); HB 0,5 až 0,8 % (od 2,8 do 3,6 %); K 0,5 až 0,8 % (od 2,2 do 3,0 %); L 0,5 až 0,8 % (od 4,4 do 5,2 %); STP 0,7 až 1,5 % (od 8,0 do 9,5 %); C 3 až 5 mmol/l (od 6 do 11 mmol/l).

Současný stupeň vývoje systému v NRL-SM vedl ke stavu, že kalibrace (pro infraanalýzátory MIR a MIR-FT) a případně výkonnostní testy jsou prováděny měsíčně pro syrové kravské mléko (T, HB, L, STP, K). Dvakrát ročně pak pro syrové ovčí a kozí mléko (T, HB, L; GRAPPIN, 1987; HANUŠ et al., 1996). Konečně čtvrtletně nebo podle požadavku pro mléčné produkty (T, HB, L) jako pasterované mléko, odstředěné mléko, sladká syrovátka řídká, sladká syrovátka hustá, (T) smetana hustá a smetana řídká, případně speciální mléčné sýrařské kompozice (T, HB, L).

Specifické vztahy referenčních a nepřímých analytických metod v mlékařství

Specifické vztahy mezi referenčními a rutinními metodami a jejich sezónní proměnlivost, stejně jako interferenční vlivy na kalibrace v mlékařských analýzách jsou dány řadou mezinárodních konvencí a skutečností sezónní proměnlivosti mléka. Dalším vlivem mohou být různá řešení principiálně podobných nepřímých metod analýz. Pouze u molekuly laktózy se jedná o sezónně stabilní složku, která má stálý vztah k použitým vlnovým délkám infraanalýzy. Zatímco obsah dusíku podle Kjeldahla je přepočten na obsah hrubých bílkovin, kalibrované filtrové infraanalýzátory měří vibrace peptidické vazby. Metoda IR je tedy specifická pro čisté bílkoviny. Je však konvenčně (IDF) kalibrována na tzv. hrubé bílkoviny. Chová se tedy k obsahu nebílkovinného dusíku jako ke konstantě odvozené z kalibrační sady. Poněvadž však obsah nebílkovinného dusíku v mléce není konstantní a kolísá významně se sezónou, může se vztah mezi referenční a kalibrovanou metodou časem, se změnami krmení krav, zhoršovat. To je dalším důvodem nezbytnosti periodicity kalibrací. Navíc je nezřídka nutná lokální specifita kalibrací, která se docílí nastavením založeným na analýze vzorků ze zóny jejich sběru. Na obsah čistých bílkovin je metodicky správně kalibrováno jen historicky ve Francii a nově v USA. Celý svět jinak kalibruje technologii IR na obsah HB. Uvedené činí nemalé problémy s porovnáváním výsledků. Pokud se týká obsahu tuku, existuje více specifických vlnových délek IR v různých zařízeních, kde vztah je buď k délce řetězců mastných kyselin, nebo frekvenci výskytu karboxylových skupin. Tedy nezávisle na délkách řetězců. Někdy se výsledky získávají kombinací výtěžnosti signálu dvou nebo více vhodných vlnových délek. Délky řetězců a stupeň nasycenosti mastných kyselin v esterech ovšem podléhají sezónním vlivům výživy dojníc. Další interferenční vlivy může zanášet případný

efekt lipolýzy vzorků ať již zdravotního původu s ohledem na krávy nebo jako důsledek mechanických, popřípadě mikrobiologických vlivů na mléko. Tyto efekty mohou v čase rozrůznit vztah reference×instrument ($R \times I$) a metody proto vyžadují pravidelnou recalibraci. Takto by bylo možné pokračovat dále výčtem dalších a dalších specifit u dalších ukazatelů kvality mléka (nejen chemických, rovněž fyzikálních, mikrobiologických, biologických nebo zdravotních (fyziologických)).

Otázka frekvence kalibrací IR pro analýzy syrového mléka

Frekvence kalibrací může být různá. Norma (ČSN 57 0536) ukládala minimálně jedenkrát za tři měsíce. V ČR se místy používá uvedený interval, ale v systému referenčně-rutinních laboratoří původně kontroly mléčné užitkovosti se od roku 1986 používá interval měsíční. Existují však i týdenní frekvence, např. pro obsah laktózy v Ontariu (MIGLIOR et al, 2006). Pro měsíční interval existuje řada výzkumně, vývojově a zkušeností podpořených argumentů, tedy teoretických i praktických:

- vliv sezóny (možných změn objemného krmení) na stabilitu shody referenční a nepřímé metody (HANUŠ et al., 2006);
- nutnost oprav významně funkčních komponent zatížených analyzátorů, které rovněž poruší vztah $R \times I$, kdy je výhodnější další oficiální termín kalibrace všech přístrojů zahrnutých do systému, než mimořádná kalibrace jednoho přístroje, která tak zanáší další zdroj nejistot do systému (opravy a výměny důležitých částí přístrojů nejsou u vytíženého systému řídké);
- na menším územním celku lze považovat centrální kalibraci na jednotné kalibrační vzorky a hodnoty za účelnější, než více separátních kalibrací v místních laboratořích (v případě centrální kalibrace se tedy s jistotou jedná o snížení zdrojů nejistot).

Výkonnostní testování ve vazbě na kalibraci – specifita mlékařských analýz

Obecně se v mlékařských analytických postupech používá ke kalibraci (z důvodu existence četných interferenčních efektů na vztah přímé (referenční) a nepřímé metody) sada více vzorků (nejčastěji desíti nebo šesti), jen výjimečně vzorek jeden, nebo dva. Podobně to platí pro metody výkonnostního testování analytické způsobilosti. Z hlediska výkonnostního testování má být zaznamenán úspěch pro metodu v laboratoři ve výkonnostním testu alespoň jedenkrát za auditem sledované období. V mlékařské analytice umožňují výsledky prvních měření sad stejných vzorků mléka všemi přístroji v síti na stávajících kalibračních hladinách také současně při kalibračním procesu vyhodnocení v rámci testování analytické způsobilosti. Měsíční kalibrační interval tak zároveň umožňuje odpovídající počet testů analytické způsobilosti. Při vzniku výsledkové neshody v testu má pak laboratoř častěji k dispozici objektivní kontrolu své práce a může tuto neshodu dříve napravit. Při neúspěchu v méně frekventních testech (1× až 2× ročně) se hůře zajišťuje náprava. Při vyšší frekvenci aplikace kalibrace a výkonnostních testů současně proto může laboratoř snadněji získat dokument o nápravě výskytu neshody, což zvyšuje provozní jistotu managementu mlékařských laboratoří.

Používané referenční metody pro přípravu referenčních standardů

V souladu s platnými internacionálními standardy (EN ISO) používáme v ČR jako referenční pro přípravu kalibračních standardů mineralizačně-destilačně-titrační Kjeldahlovu metodu (ČSN 57 0530) určení obsahu dusíku v mléce a následně (faktor 6,38) obsahu hrubých bílkovin. Podobně pak modifikovanou se srážecím a filtračním postupem pro obsah kaseinu (uvedené platí celosvětově). Pro L je to metoda polarimetrická (ČSN 57 0530), i když lze vybírat z širšího spektra. Pro STP metoda gravimetrická (ČSN 57 0530). Kryoskopické metody jsou převážně používány jako přímé měření v RUL. Jen místy je využíván

screeningový postup konduktometrického měření s regresním výpočtem BMM podle zohlednění obsahu tuku a bílkovin. Podobně je tomu u koncentrace močoviny (LEFIER, 1999; BROUTIN, 2000, 2006), která je často měřena v RUL v ČR přímou metodou (např. Ureakvant; HANUŠ et al., 2001). Někdy ovšem i kalibrovanou nepřímou metodou MIR-FT (infraanalýza ve středové oblasti s technologií Fourierových transformací). Infraanalýza C byla kalibrována na výsledky jejího fotometrického stanovení ve srovnávacích vzorcích mléka.

Nové zavedení legislativně platné referenční metody pro obsah mléčného tuku

Pouze obsah tuku byl doposud všude v celé ČR kalibrován podle výsledků acidobutyrometrické metody podle Gerbera (G). To nebylo v souladu se světovými standardy. NRL-SM proto v roce 2006 ověřovala a provedla validaci a odhad nejistoty výsledků měření mezinárodně uznané referenční extrakčně-gravimetrické metody podle Röse-Gottlieba (R-G). Uvedené bylo provedeno ve vazbě na výkonostní testování analytické způsobilosti ICAR-CECALAIT, AFEMA a vnitrolaboratorní srovnání výsledků s dříve akreditovanou a mezinárodně kontrolovanou metodou G. V roce 2007 pak NRL-SM přešla na přípravu kalibračních standardů pomocí akreditované metody R-G. Metoda R-G byla v ČR doposud legislativně respektována, ale nikým neaplikována. Hlavním důvodem, proč se metoda v relevantních laboratořích prakticky nepoužívala je její pracnost, nepříjemnost až nebezpečnost. Z prvních výsledků uvedeného testování jako validace metody R-G v porovnání k metodě G (práce byla provedena na identických vzorcích mléka) bylo zjištěno, že korelace mezi metodami byly zpravidla na úrovni $r = 1,0$. Dále, že pokud se jedná o vyjádření věrohodnosti výsledků (správnosti), z hlediska reprodukovatelnosti je metoda R-G $6,3\times$ „hodnotnější“ než G, z hlediska opakovatelnosti $6,6\times$ „lepší“ a z hlediska vyjádření nejistoty výsledků $4,0\times$ „spolehlivější“ („jistější“) než G (Tab. 1, 2 a 3).

Výkonostní testování analytické způsobilosti mlékařských laboratoří

V mléčných laboratořích jsou pro hodnocení testů způsobilosti nejčastěji používány systémy:

- Euklidická vzdálenost (E; LERAY, 1993; ICAR testy a národní testy NRL-SM pro T, HB, L, M a BMM) od počátku (výhodou je dvourozměrný rozklad výsledkové neshody na systematický a náhodný zdroj chyby a design přednostně uzpůsobený více-vzorkovým mlékařským testům), jako zřejmě nejlepší způsob vyhodnocení, kde tabulkové vyjádření poskytuje řazení účastníků podle věrohodnosti dosažených výsledků;
- Youden plot, používaný v testech AFEMA (FUCHS, 2000) uzpůsobený pro dvou-vzorkové designy testů (výhoda zdrojového rozkladu výsledkové neshody);
- Z-score (WOOD, 1994, 1998; COVENEY, 2001; APLAC, ASLAB a národní testy NRL-SM pro BMM) pro jedno-, dvou- i více-vzorkové designy testů (neposkytuje výhodu zdrojového rozkladu výsledkové neshody).

Často se v mlékařských výkonostních testech uplatňuje také vyčíslení, resp. zobrazení recovery pro speciálně vybrané nebo připravené vzorky z kontrolní sady. Např. při analýzách obsahu dusíku ve známých koncentracích roztoků aminokyselin jako glycin nebo tryptofan pro kontrolu analýzy podle Kjeldahla (jako ICAR-CECALAIT) nebo močoviny v mléce (jako NRL-SM). Uvedené umožňuje lepší orientaci při vyhodnocování testů v mezních situacích, když by distribuce hodnot použité pro odvození referenčních hodnot vzorků v testu podlely nějaké náhodné anomálii, třeba v situaci nižšího počtu účastníků. Často jsou např. v mléce pro multikomponentnost mléčné matrice problémem přípravy nulových standardů pro kalibrované metody. Příkladem může být většina mléčných složek, zejména močovina. Proto má zavedení určení recovery v mléčných testech zvláštní význam.

Vlastním problémem je stanovení diskriminačních limitů výkonnostních testů. I když existují statistické konvence (testy odlehlosti a Z-score na hladině pravděpodobnosti 5 %), přesto některé postupy jsou specifické (ICAR-CECALAIT) a vyřazují účastníky testů mnohem přísněji. Derivace diskriminačních limitů tak nejsou zdaleka jednotné. Dlouhodobým porovnáním některých používaných systémů byly nalezeny následující výsledky pro vyřazování účastníků: ICAR (referenční metody): pro T 34,7±9,8 % (dříve 56,9±8,5 %), pro HB 41,6±10,1 % (dříve 56,1±8,1 %), pro L 19,4±8,1 % (dříve 39,7±13,7 %), pro M 36,3±9,2 %; APLAC (referenční metody, sušené mléko) pro vlhkost 15,4 %, pro obsah popela 12,6 %, pro T 23,5 %, pro HB 12,5 %; ASLAB (rozbory vod) různé analýzy 8,0±9,8 %; AFEMA (referenční analýzy mléka) 7,2±5,0 %; NRL-SM (rutinní analýzy mléka) pro T 24,0±5,7 %, pro HB 18,1±8,3 %, pro L 18,0±8,8 %, pro M 16,1±11,8 % a pro BMM 25,0 % (HANUŠ et al., 2006). Jsou zřejmě výraznější rozdíly v diskriminaci výsledků. Pro zdravou praktickou motivaci účastníků, pro reálné přijímání praktických opatření k řešení výsledkových neshod, vedení jejich evidence a účinné průběžné zlepšování výsledků laboratorní sítě lze ovšem na základě empirie za optimální považovat hodnoty diskriminace max. do 15 %. Je zcela jistě problematická diskriminace na úrovni např. 50 % (ale již > 30 %; uvedené v podstatě paralyzuje síť i důvěryhodnost testu), když např. nevyhovující odchylka HB od středu je již na úrovni $d \geq \pm 0,03$ %, což znamená relativní analytickou chybu na úrovni pouze 1 %.

Nejistoty výsledků a diagnostika výskytu chyb v mlékařských analýzách

Nejistoty se v mlékařství stanovují samozřejmě podle kovariančního zákona o šíření nejistot, kde pod odmocninou jsou umístěny zdroje variability měření podle inherentních vlastností použitých metod, jejich konkrétních výsledků v jednotlivých laboratořích a podle existujících vztahů přímých (tvorba referenčních standardů) a nepřímých metod v systému. Z důvodů řady principiálních a praktických rozdílů pak pochopitelně vypadají sestavy zdrojů nejistot pro různé kvalitativní ukazatele mléka odlišně. Výsledné příklady rozšířených hodnot výsledkových nejistot pro některé analyty v mlékařské laboratoři (NRL-SM) jsou uvedeny v Tab. 4.

Vynášení výsledků výkonnostního testování do komparativních nebo průtočných kontrolních diagramů a stanovení limitních hladin těchto diagramů umožnilo určitou grafickou diagnostiku charakteru a původu výsledkových neshod (HANUŠ et al., 2004 a 2005). Pro tento způsob hodnocení (NRL-SM) a možnou účinnost praktické interpretace výsledků mají také podstatný význam:

- způsob, jakým jsou hodnoty zanášeny ve smyslu situace (časové a technické) v celém laboratorním systému, zda se jednalo o výsledky kalibrace, výsledky výkonnostního testu, srovnání na jedné vzorkové sadě (bezprostředně po sobě – výkonnostní test a kalibrace), srovnání na dvou vzorkových sadách (se zahrnutím kalibračního intervalu);
- technická znalost konkrétního laboratorního systému s jeho aktuálním vývojem (opravy zařízení, výpadky zdrojů, poruchy, podezřelé vzorky atd.).

Zatímco komparativní grafy jsou určeny pro systémovou (skupina infraanalyzátorů a laboratoří) kontrolu a diagnostiku případných chyb výsledků, průtočné diagramy pro přístrojovou (individuální metodické jednotky) kontrolu a diagnostiku případných chyb výsledků.

Tab. 1 Výsledky validace metody RG (g/100g) v NRL-SM při stanovení reprodukovatelnosti (R), resp. správnosti (S).

	RG – RG-I	G – RG-I	G – RG
n	11	11	40
d	-0,00014	0,00909	0,00431
sd	0,00697	0,04392	0,03836
t-test	0,06	0,69	0,71
význ.	ns	ns	ns

RG = Röse-Gottlieb; G = Gerber; I = ICAR; ns = $P > 0,05$.

Podle ČSN R nebo S pro MIR = $\leq 0,06$ %, obvykle 0,04 %. Výsledky dokládají, že R, resp. S pro RG je 6,3× lepší než pro G.

Tab. 2 Výsledky validace metody RG (g/100g) v NRL-SM při stanovení opakovatelnosti (O).

	O g/100g	r %
G	0,0376	1,09
RG	0,0057	0,16

RG = Röse-Gottlieb; G = Gerber; I = ICAR.

Podle ČSN O pro MIR = $\leq 0,02$ %, obvykle 0,01 %. Výsledky dokládají, že O pro RG je 6,6× lepší než pro G.

Tab. 3 Výsledky validace metody RG (g/100g) v NRL-SM při stanovení nejistoty výsledků (N).

	Prostá 67 %	Rozšířená ($\times 1,96$) 95 %
MIR (MSc)	0,0520	0,101
G	0,0363	0,071
RG	0,0090	0,018

RG = Röse-Gottlieb; G = Gerber; MIR (MSc) = MilkoScan, metoda infraanalýzy mléka.

Výsledky dokládají, že N pro RG je 4,0× lepší než pro G.

Tab. 4 Příklady hodnot rozšířených (95 % pravděpodobnosti) výsledkových nejistot v NRL-SM.

Složka, vlastnost	Jednotka	N absolutní	N relativní %
Tuk	g/100g	0,0710	2,16
Bílkoviny	g/100g	0,0563	1,70
Laktóza	g/100g	0,0820	1,68
Močovina	mmol/l	0,3673	8,31
BMM	°C	0,00608	1,18
PSB	103/ml	17,6456	9,3
T	g/100g	0,101	2,77
B	g/100g	0,085	2,59
L	g/100g	0,115	2,37

Tuk, bílkoviny, laktóza v mléce, bod mrznutí mléka (BMM) = referenční metody; T, B, L = přístrojová MIR analýza, kalibrovaná metoda podle výsledků referenčních metod; močovina fotometricky a počet somatických buněk (PSB) fluoro-opto-elektronicky.

Literatura

BIGGS, D. A.- JOHANSSON, G.- SJAUNJA, L. O.: Analysis of fat, protein, lactose, total solids by infra-red absorption. Bulletin of the International Dairy Federation, Doc. 208, 1987, 21-29.
COVENEY, L.: Milk testing proficiency scheme, Round 26 – November 2001. Example laboratory, Savant Technologies, 2001, 12.

- ČSN 57 0530: Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. (In Czech) ČNI, Praha, 1972.
- ČSN 57 0536: Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem. ČNI, Praha, 1999.
- BROUTIN, P. J.: New applications of mid-infra-red spectrometry for the analysis of milk and milk products. 1 Casein. Bulletin of the International Dairy Federation, 406, 2006, 2-21.
- 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.
- 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 2000, Slovenia.
- FUCHS, M.: Der AFEMA-Sternstest: ein Beitrag zur internationalen Harmonisierung der Rohmilchanalytik. XXVIII ÓVÁRI TUDOMÁNYOS NAPOK, Mosonmagyaróvár 2000, 71-75.
- GRAPPIN, R. Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis - application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. Bulletin of the International Dairy Federation, Doc. 208, IDF Provisional Standard 128, 1987, 3-12.
- GRAPPIN, R.: Application of indirect instrumental methods to the measurement of fat and protein content of ewes and goats milk. Bulletin of the International Dairy Federation, Doc. 208, 1987, 41-43.
- GRAPPIN, R. 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 1993, 205-211.
- GRAPPIN, R.- LEFIER, D.: Reference and routine methods for the measurement of nitrogen fractions in milk and whey. Cheese yielding – factors affecting its control, IDF Seminar, Cork, 1993, In Seminar proceedings, 5.1 Measurement of casein and other analytical methods, 1993, 191-203.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- MACEK, A.- KLIMEŠ, M.- HERING, P.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Vyhlazení driftů křivek kalibračních hladin IR-analýzy syrového kravského mléka během sezóny a odhady jejich adekvátního kolísání a optimální délky kalibračního intervalu – retrospektivní studie. Výzkum v chovu skotu, XLVIII, 176, 4, 2006, 1-9.
- HANUŠ, O.- MAREŠ, V.- FICNAR, J.- GABRIEL, B.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Rutinní sériové analýzy základního složení kozího mléka v kontrole mléčné užitkovosti. Mliekárstvo, 1996, 27, 1, 35-39.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- JEDELSKÁ, R.: Diagnostic use of proficiency testing in dairy laboratory. Acta agriculturae slovenica, 2004, 84, 1, 37-42.
- 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), 2001, XLIX, 3, 143-154.
- HANUŠ, O.- JANŮ, L.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- MACEK, A.- GENČUROVÁ, V.- ZAJÍČKOVÁ, I.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Vývoj systému a komparativní studie diagnostických grafických prostředků pro redukci výskytu chybovosti výsledků při rutinních analýzách základního složení mléka. Výzkum v chovu skotu, 2005, XLVII, 169, 1, 1-27.
- 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. Výzkum v chovu skotu, 2005, XLVII, 170, 2, 8-18.

- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.: Quality assurance of protein analyses in the Czech milk recording system. In Focus, 2006, 30, 1, 16-18.
- HANUŠ, O.- FICNAR, J.: Kjeltac as a tool for calibration of infrared milk analyzers. In Focus, The Tecator journal of technology for chemical analysis, 1990, 13, 1, 15-17.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- MACEK, A.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- ZAJÍČKOVÁ, I.: Zajištění kvality výsledků analýz složení mléka modifikacemi testů laboratorní způsobilosti. Výzkum v chovu skotu, 2006, XLVIII, 173, 1, 1-19.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- MACEK, A.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Sezónní trendy hladin měření při kalibracích nepřímé metody infračervené analýzy základního složení syrového kravského mléka - retrospektivní studie. Výzkum v chovu skotu, 2005, XLVII, 171, 3, 1-14.
- HANUŠ, O.- JANŮ, L.- KLIMEŠ, M.- HERING, P.- ZAJÍČKOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- MACEK, A.: Postupy odhadů a použití diskriminačních limitů pro hodnocení správnosti výsledků při testování mlékařských laboratoří. Výzkum v chovu skotu, 2006, XLVIII, 174, 2, 1-17.
- HANUŠ, O.- LERAY, O.- PYTLOUN, J.- MENEGAIN, E.- TROSSAT, P.- GENČUROVÁ, V.- MATOUŠ, E.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- DOLÍNKOVÁ, A.: Retrospektiva vlivu celosvětové laboratorní integrace na zvyšování věrohodnosti výsledků v oboru mlékařské analytické práce. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. (Brno), 2000, XLVIII, 4, 121-131.
- 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.
- LERAY, O.: CECALAIT: an organization to support analytical quality assurance in dairy laboratories. V: Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories. Sonthofen / Germany, 1992 -05-18/20, Brussels, 1993, 349-360.
- MIGLIOR, F.- SEWALEM, A.- JAMROZIK, J.- KISTEMAKER, G.- LEFEBVRE, G. M.- MOORE, R. K.: Genetic analysis of MUN and lactose and their relationships with economically important traits in Canadian Holstein cattle. 35th ICAR and Interbull Meeting, Kuopio, Finland, 2006.
- WOOD, R.: Proficiency testing and accreditation of food analysis Laboratories. 1. Conference on practical application of European legislation on foodstuffs. Bled, Slovenia 1994-10-5/17, Ljubljana, 1994, 55-65.
- WOOD, R.- NILSSON, A.- WALLIN, H.: Role of proficiency testing in the assessment of laboratory quality. In Quality in the food analysis laboratory. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1998, 172-202.

B) Podpora pozitivního vývoje kvality stanovení minoritních metabolicko-diagnostických složek mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT)

Minoritní složky mléka jako energeticko-dusíkaté metabolity

V poslední době je stále větší důraz kladen na zajištění dobrého zdraví a welfare hospodářských zvířat pro podporu bezpečnosti potravinového řetězce. V mléce je řada látek, podle kterých lze poměrně spolehlivě metodou neinvazivního monitoringu posuzovat a kontrolovat zdravotní stav dojnic. Vedle majoritních složek, jako je obsah tuku, bílkovin (a jejich poměr tuk/bílkoviny) nebo laktózy, popřípadě počet somatických buněk, jsou to složky minoritní. Jedná se o metabolity s úzkou vazbou na výživový stav dojnic. Mezi tyto patří např. kyselina citrónová, močovina, volné mastné kyseliny nebo ketony. Poslední tři jsou považovány za metabolity nežádoucí. Mléko, na rozdíl od krve nebo moče jako dalších biologických tekutin, zajišťuje poměrně snadný odběr vzorků, který je dnes na individuální (zvířata) i bazénové (celá stáda) úrovni poměrně rutinně a systematicky zvládnut, včetně

chlادového transportu do laboratoří. Kvalita analytických výsledků rozhoduje významně o správnosti jejich praktické interpretace a účinnosti případných preventivních, nápravných nebo léčebných opatření v chovech nebo o možnostech zajištění kvality mléčného potravinového řetězce.

Stanovení a interpretace kyseliny citrónové (KC) v mléce

Obsah kyseliny citrónové (KC) v mléce je vhodným ukazatelem energetického metabolismu dojnic (ILLEK a PECHOVÁ, 1997; BATICZ et al., 2002; GARNSWORTHY et al., 2006) a použitelnosti mléka v sýrařství. Fyziologicky souvisí s efektivitou Krebsova cyklu a přispívá ke kapacitě pufrčního systému mléka. KC v mléce pozitivně korelovala s plazmatickou glukózou a negativně s celkovým plasmovým proteinem v krvi (0,46 $P < 0,01$ a -0,31 $P < 0,01$; KHALED et al., 1999). KUBEŠOVÁ et al. (2009) našli vliv kyseliny citrónové na luteální aktivitu ovárií u dojnic. Aktuální znalost této hodnoty může posloužit v poradenském servisu ke zlepšení výživy dojnic, jejich reprodukce nebo zpracování mléka. Fyziologické rozpětí představuje 8 až 10 mmol.l^{-1} KC v mléce (0,149 až 0,187 %). Nižší hodnoty indikují energetický nedostatek metabolismu krav a vyšší hodnoty přebytek. Proto mléčné laboratoře zavádějí určení KC. Vhodnou rutinní metodou pro stanovení KC může být MIR-FT.

Stanovení a interpretace močoviny (M) v mléce

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^{-1} . Mezi efekty, které koncentraci močoviny v mléce 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 močoviny);
- zdravotní stav, zvláště funkčnost jater a ledvin;
- některá onemocnění;
- pastva (vyšší obsah močoviny na pastvě);
- doba odebrání vzorků mléka (ve smyslu intervalu mezi krmením a odběrem);
- fyziologické faktory laktace (HANUŠ et al., 1993 c; JÍLEK et al., 2006).

Koncentrace močoviny v mléce (KMM) je tedy respektovaným ukazatelem zdravotního a výživového stavu dojnic (BAKER et al., 1995). Je ve vztahu k jejich reprodukci (BUTLER et al., 1996), dlouhověkosti (HANUŠ et al., 2000) a technologickým ukazatelům mléka (KIRST et al., 1985; HANUŠ et al., 1993 a, b), které ve vyšší koncentraci pravidelně zhoršuje.

Správnost interpretací výsledků KMM závisí na jejich věrohodnosti, která je tak velmi důležitá. Existuje mnoho principů analýz KMM. Jejich výsledky mohou být ovlivněny řadou interferenčních faktorů. 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 a, b; Bentley Instruments, USA) nebo enzymaticko-konduktometrická metoda UREAKVANT (FICNAR, 1997; HANUŠ et al., 1995, 1997, 2001 a; KLOPČIČ et al., 1999; ČR) a nepřímé jako MIR (HERRE, 1998) a zejména MIR-FT (PETERSON et al., 2004).

Stanovení a interpretace volných mastných kyselin (VMK) v mléce

Malý podíl mastných kyselin v mléce, které nejsou esterifikovány v triglyceridech, je volně rozptýlen hlavně v tukové a mírně ve vodné fázi a je označován za volné mastné kyseliny (VMK). Běžný obsah VMK u mléčného tuku leží mezi 0,5 až 1,2 mmol.100g⁻¹, maximální povolený je 13,0 mmol.kg⁻¹ pro metodu stlukem nebo 32,0 mmol.kg⁻¹ pro metodu extrakčně-titrační (ČSN 57 0529). Gerberova acidobutyrometrická metody zachycuje až 90 % obsahu VMK do tukového podílu mléka, naopak extrakčně-gravimetrická metoda podle Roesse-Gottlieba VMK do tukového podílu nezahrnuje tak spolehlivě, resp. ztrácí jich až 70 % (KERKHOFF MOGOT et al., 1982).

Zvýšení VMK znamená negativní vlivy typu lipolýzy, obvykle z důvodů metabolických problémů dojnice. Zvýšená koncentrace VMK způsobuje zhoršení technologických vlastností mléka (VYLETĚLOVÁ et al., 2000, a, b), ale hlavně zhoršení smyslových (senzorických) vlastností mléka, chuti a vůně. Uvedené má za následek nahořklou pachut', jež může poškodit kvalitu mlékárenských výrobků. Destrukce tuku je jevem zapříčiňovaným v mléce přirozenými enzymy (lipázami) nebo lipázami dodanými bakteriální kontaminací mléka. Lipolýza je proto spontánní nebo indukovaná. Lipázy přitom mohou být termorezistentní a projevit se tak i po tepelném ošetření mléka rozkladem mlékárenských výrobků. Nešetrné zacházení s mlékem, jako časté čerpání a čerání při manipulaci a namrzání, navozuje rovněž vlastní lipolýzu. Dodaná energie tepelná nebo mechanická do multikomponentního systému mléka porušuje blány tukových kapének a uvolňuje mastné kyseliny z esterické vazby triglyceridu. Proto proud mléka by neměl přesáhnout rychlost 1 až 1,5 m.s⁻¹. Nedostatečná hygiena ustájení a dojení krav, stejně jako špatné uložení a ošetření syrového mléka, mohou vést k pomnožení nežádoucí psychrotrofní, termorezistentní a sporulující mléčné mikroflóry. Uvedené může zvýšit intenzitu lipolýzy.

VMK, směs lipolýzou uvolněných mastných kyselin z mléčného tuku nebo přešlých z krve, poměrově ovlivnitelná výživou zvířat, sezónou nebo jejich zdravotním stavem, je jako taková, striktně analyticky a tím molárně, těžko uchopitelná, vyjádřitelná nebo interpretovatelná. Analyticky se jedná o výsledek titru roztokem alkálie, který není v konstantním poměru k molárním koncentracím jednotlivých mastných kyselin. Jako konvenční interpretace však tento způsob vyjádření dobře vyhovuje praktickým mlékařským účelům. Hodnoty VMK mohou posloužit ke kontrole zdravotního stavu dojnic nebo kvality syrového mléka s ohledem na kvalitu a udržitelnost následných mléčných výrobků. Referenčními a rutinními metodami analýzy VMK mohou být tzv. metoda extrakčně-titrační, stluková, BDI nebo MIR a MIR-FT.

Stanovení a interpretace ketonů v mléce

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 - ketolátek v krevním séru a následně i v mléce dojnice. Obsah ketolátek (acetonu, acetoacetátu a BHB

(betahydroxybutyrátu)) v individuálních vzorcích mléka je indikátorem zdravotního stavu dojnic po porodu a v první třetině laktace ve smyslu výskytu produkčního onemocnění, ketóz. Ketózy jsou, v období vzniku 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, ale průběžně také ke vzrůstu obsahu ketonových látek v tělních tekutinách. 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 ketóz je redukována dojivost i obranyschopnost (riziko zvýšeného výskytu nových mastitidních infekcí) a zhoršena plodnost krav. Kromě dalších příznaků může onemocnění vyústit i v úhyn zvířete. Léčba je nezbytná, avšak s důsledky všech ztrát nákladná. Názory na kritickou diskriminační hodnotu obsahu acetonu v mléce, resp. limit pro určení subklinické ketózy se značně různí od 4 do 40 mg/l (UNGLAUB, 1983; ANDERSSON a EMANUELSON, 1985; GRAVERT et al., 1986; GUSTAFSSON a EMANUELSON, 1993; HANUŠ, 1994). Obě mezní hodnoty se však jeví být přehnané, nad-, resp. podhodnocené. Na základě předchozích výsledků (HANUŠ, 1994; 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. Hladina acetonu je také ovlivnitelná sezónou nebo konzervovanými objemnými krmivy. Prevence zlepšením výživy je efektivnější cestou eliminace výskytu ketóz než léčba. Součástí prevence je monitoring stavu dojnic po otelení, ke kterému slouží právě stanovení koncentrace ketolátek nebo acetonu v tělních tekutinách.

Kvalita mléka od dojnic s metabolickými problémy je zhoršena. V subklinických případech takové mléko nelze ve stáji z dodávky rutinně vyřazovat, na rozdíl od subklinických mastitid. Bez této možnosti eliminace se dostává do mlékárny. Zde může metabolicky zatížené mléko ohrožovat kvalitu průběhu zpracovatelských technologií. Korelace acetonu k jogurtovému testu činila -0,21 (HANUŠ et al., 1993 a, b). Byla však spíše dána souběžně změněnými ostatními vlastnostmi mléka, než samotnou zvýšenou koncentrací acetonu.

Popisované metody stanovení ketonů nebo acetonu v mléce jsou nejčastěji fotometrické metody, MIR-FT, ale také různé semikvantitativní stájové testy, včetně možnosti konstrukce biosenzoru na bázi Clarkova kyslíkového článku pro determinaci beta-hydroxybutyrátu (JÍLEK, 2008).

Použité nepřímé rutinní metody MIR a MIR-FT

Filtrová technologie infraanalýzy (MIR) je využívána především ke stanovení majoritních složek mléka (tuk (T), bílkoviny (B), laktóza (L), sušina tukuprostá atd.). K tomu účelu ovšem slouží i analytická technologie MIR-FT (LEFIER et al., 1996). MIR stanovení minoritních složek (močovina, volné mastné kyseliny) mléka bylo obvykle méně úspěšné. Technologie MIR-FT začíná být využívána ke stanovení kaseinu, minoritních složek a metabolitů jako jsou volné mastné kyseliny, močovina, kyselina citrónová nebo ketony. Metody MIR a MIR-FT zahrnují středovou oblast IR oboru s technologií optických filtrů a měření celého IR spektra s použitím Fourierových transformací. Byly dodrženy standardní postupy práce s infraanalýzátory (ČSN 57 0536). Jako nepřímá metoda MIR-FT byly použity přístroje Lactoscope FTIR (Delta Instruments, Holandsko) a MilkoScan FT 6000 (Foss Electric, Dánsko) a jako MIR přístroj Bentley 150 (Bentley Instruments, USA). Vedle metod MIR a MIR-FT se při analýze jak majoritních, tak některých minoritních složek mléka uplatňuje i metoda NIR-FT (near infrared, Fourierovy transformace; TSENKOVA et al., 2000; KUKAČKOVÁ et al., 2000; JANKOVSKÁ a ŠUSTOVÁ, 2003; KRÁČMAR et al., 2004; ŠUSTOVÁ et

al., 2006, 2007). Analýzy byly převážně provedeny v laboratořích akreditovaných podle ČSN EN ISO/IEC 17025, v LRM Buštěhrad a LRM Brno-Tuřany a v NRL-SM.

Použité přímé referenční metody a příprava, případně úpravy referenčních vzorků

1) Jako referenční pro KC a kalibraci MIR-FT byla použita fotometrická metoda (c; 428 nm). Mléko bylo koagulováno, filtrát reagoval s pyridinem v acetanhydridu na žlutý komplex. Spekol 11 byl kalibrován prostřednictvím sedmibodové škály od 1,5 do 20,0 mmol.l⁻¹. Referenční sada pro MIR-FT zahrnovala 10 vzorků mléka, z toho 7 přirozených, z nichž některé byly zdvojeny pro kontrolu opakovatelnosti a 3 s umělými přísadami KC.

2) Močovina (M) byla měřena (I) v deseti nativních vzorcích mléka, kde čtyři byly s umělým přísadkem močoviny pro určení rozdílové recovery. Dále (II) byla M měřena v deseti specificky připravených vzorcích na mléčné bázi (alkalicky rekonstituovaný tuk a bílkoviny po kyselém srážení a promývání, bez laktózy, močoviny, citrátů, ureázy a dalších rozpustných složek) se známými přísadkami močoviny k nulové hodnotě. Celkem bylo sedm účastníků srovnání. Jako metody (HANUŠ et al., 1995, 1997, 2001 a, 2008 c; HERING et al., 2008) byly použity: fotometrická s diacetylmonoximem (BI); fotometrická s paradimetylamino-benzaldehydem (Ehrlichovo činidlo, EH); ureolyticko-konduktometrická (Ureakvant, UR); MIR-FT (MilkoScan FT 6000, Foss Electric, Dánsko). Zatímco např. u majoritních složek mléka (tuk, bílkoviny, laktóza, sušina, sušina tukuprostá) jsou známy závazné standardní referenční metody (extrakčně-gravimetrická podle Roesse-Gottlieba; mineralizačně-titrační podle Kjeldahla; např. polarimetrická), u močoviny tomu tak není, podobně jako u KC nebo ketonů. Podle materiálů IDF (International Dairy Federation; LEFIER, 1999) za referenční jsou v případě M považovány především specifické ureolytické metody, v tomto případě UR.

3) Zvýšení VMK ve vzorcích referenční sady (n = 8) bylo dosaženo vlivem mechanicky indukované lipolýzy (SJAUNJA, 1984; KOOPS et al., 1990; HANUŠ et al. 2008 b). Variační obor kalibrační sady byl od 0,69 do 5,19 mmol/100g tuku. Rozpětí přirozených hodnot VMK bylo od 0,69 do 3,60 a manipulovaných od 2,74 do 5,19 mmol/100g tuku. Hodnoty byly také přepočteny podle aktuálního obsahu tuku v jednotlivých vzorcích na mmol/kg mléka. Byla dosažena dobrá opakovatelnost při paralelních měřeních všech vzorků (čtyř vzorků původních a čtyř subvzorků po mechanické námaze) referenční stlukovou metodou stanovení VMK (ČSN 57 0533).

4) Byl vyvinut Ketotest pro semikvantitativní stanovení ketonů v mléce. Ketotest byl testován v reálných podmínkách proti fotometrickému stanovení acetonu v mléce (mikrodifúzní metoda se salicylaldehydem; VOJTÍŠEK, 1986) a stanovení ketonů v moči u identických zvířat pomocí diagnostických proužků Ketophan. Běžná fotometrická mikrodifúzní metoda stanovení acetonu v mléce (VOJTÍŠEK, 1986; HANUŠ et al., 1993 a, 1999, 2001 b, c) nemůže naplnit v tradičním designu požadované ukazatele efektivity pro praktické nasazení v kontrole mléčné užitkovosti. Otázkou je do jaké míry může posloužit jako referenční pro MIR-FT, což bude předmětem dalšího výzkumu, vývoje nebo inovací.

Vyhodnocení věrohodnosti výsledků

Byly zohledněny obecné analytické a statistické poznatky a zásady posouzení věrohodnosti získaných analytických výsledků získané z následujících prací: ECKSCHLAGER, 1961; ECKSCHLAGER et al., 1980; GRAPPIN, 1987, 1993; LERAY, 1993; MELOUN a MILITKÝ, 1992, 1994; WOOD, 1994; GOLC-TEGER et al., 1996; GOLC-TEGER, 1996, 1997; KUPKA, 1997; WOOD et al., 1998; HANUŠ et al., 1998; SUCHÁNEK et al., 1999; FUCHS, 2000; COVENEY, 2001; FEINBERG a LAURENTIE, 2006. Tyto postupy také vyplývají ze systémů výkonnostních testování mlékařské analytické způsobilosti provozovaných pod hlavičkami ICAR, IDF a AFEMA. Výsledky byly, vedle základních statistických charakteristik a metody lineární

regrese, vyhodnoceny prostřednictvím ukazatele Euklidické vzdálenosti od počátku, jejichž složkami (souřadnicemi) jsou průměrná diference od referenčního průměru (d ; z hlediska laboratorní interpretace zpravidla složka systematické chyby) a variabilita individuálních rozdílů (sd ; resp. složka náhodné chyby) od referenčních vzorkových hodnot.

Zajištění stanovení KC v mléce pomocí MIR-FT

Důležitým předpokladem věrohodnosti rutinních výsledků je relevantní kalibrace MIR-FT. Do některých referenčních vzorků mléka ($n = 10$) byla přidána KC ($n = 3$) pro stanovení recovery. Průměr byl $9,220 \pm 3,094 \text{ mmol.l}^{-1}$ ($0,172 \pm 0,058 \%$). Přídavková diferenční výtěžnost KC pro metodu c byla od 100,8 do 120,2 %. Korelační koeficienty mezi výsledky c a MIR-FT činily 0,979 až 0,992 (Obr. 1; $P < 0,001$), v sadě pro vzorky nativního mléka ($n = 7$) byly nižší, 0,751 (Obr. 2; Lactoscope FTIR; $P < 0,05$) až 0,947 (MilkoScan FT 6000; $P < 0,001$). Korelační vztahy mezi nakalibrovanými přístroji MIR-FT byly od 0,958 do 1,0 ($P < 0,001$). Průměrná hodnota výtěžnosti pro přístrojová měření ($n = 12$) byla $101,6 \pm 18,1 \%$ (Lactoscope FTIR $110,6 \pm 3,9 \%$; MilkoScan FT 6000 $92,6 \pm 22,6 \%$). Průměrné diference metody c a MIR-FT po kalibracích byly relativně nízké. Směrodatná odchylka individuálních diferencí byla od 0,0074 do 0,0187 % u MilkoScan FT 6000 a od 0,0105 do 0,0117 % pro Lactoscope FTIR. Relativní variabilita individuálních rozdílů při kalibraci (MIR i MIR-FT) pro majoritní složky mléka jako tuk (T), bílkoviny (B) a laktózu (L) dohromady a minoritní složky jako M, KC a obsah volných mastných kyselin (VMK) byla odhadnuta na 1,00 a 6,12 %, 7,20 a 34,40 %. Výsledky následného výkonostního testu MIR-FT pro stanovení KC dva měsíce po provedení experimentální přístrojové kalibrace s nativními bazénovými vzorky mléka ($n = 10$) jsou shrnuty na Obr. 3. Jeví se jako přijatelné. Výsledek pro kalibraci KC je přirozeně horší, než bývají pravidelně výsledky pro T, B a L jako mléčných složek majoritních. Při srovnání výsledku kalibrace KC k výsledku VMK lze tento považovat naopak za lepší pro věrohodnost analytických výsledků (FOSS, 2004) a je dále srovnatelný k výsledku kalibrace MIR-FT na koncentraci močoviny v mléce. Výsledky kalibrací je možné hodnotit jako příznivé a výsledky měření jako vhodné pro praktický screening zdravotního stavu dojníc podle koncentrace KC v mléce.

Zajištění stanovení urey v mléce pomocí MIR-FT

I) Po prvním (1) vyhodnocení ($n = 7$) byly do dalšího 2 ($n = 5$) diskvalifikovány výsledky metod BI-1 a BI-2 pro nízkou recovery, slabé korelace k dalším metodám, vyšší náhodné chyby (NCH) a největší systematickou chybu (SCH). Vyhodnocení 2 je efektivnější s přísnějšími diskriminačními limity (Obr. 4 a 5). Korelace všech metod navzájem (0,977 až 0,998; $P < 0,001$) potvrzují metody jako efektivní s výjimkou BI-2 s velmi slabými korelacemi (0,713 až 0,774), slabou recovery (16,0 až 69,0 %) a vysokou NCH $\pm 5,292 \text{ mg/100ml}$. Recovery lepších metod byla 44,0 až 96,7 %. Metoda BI-1 měla dobré korelace (0,986 až 0,994; $P < 0,001$), větší SCH $-7,546 \text{ mg/100ml}$ a slabší recovery (48,5 až 75,3 %). BI-1 byl případ chybného provedení metody. U metody BI by více vzorků v kalibraci mohlo zlepšit postup. Metoda MIR-FT (infraanalýza) měla dobrou přídavkovou recovery 69,5 až 95,0 % a korelace 0,981 až 0,994 ($P < 0,001$). Metoda EH měla dobrou recovery 59,0 až 96,7 %, mírně větší SCH 4,755 (1) a 2,556 (2) mg/100ml a těsné korelace 0,977 až 0,994 ($P < 0,001$). Metoda UR vykazovala nejlepší kombinace výsledků u recovery, korelací, SCH i NCH. Měření KMM bylo téměř nezávislé na tuku v mléce ($r = 0,16$ pro UR a 0,01 pro MIR-FT; $P > 0,05$) a nevýznamně vzrůstala KMM obou metod se vzrůstem laktózy ($r = 0,16$ a 0,27; $P > 0,05$), který logicky klesal ($r = -0,88$; $P < 0,001$) při koncentrování tuku. Vztah výsledků KMM mezi UR a MIR-FT byl významný (validační $r = 0,96$; $P < 0,001$) při průměrné diferenci $-0,93 \pm 1,663 \text{ mg/100ml}$. Po provedení kalibrace MIR-FT podle výsledků UR lze věrohodnost výsledků považovat za dobrou. Pro metody měření KMM není třeba vlivy tuku, bílkovin a laktózy

pokládat za podstatné. Metoda MIR-FT pro KMM za použití vzorků nativního mléka, případně s přísadkou urey, měla dobrou věrohodnost. Metodu MIR-FT je vhodné kalibrovat specifickým určením KMM (UR). Významnější (HERING et al., 2008) pro eliminaci disproporcí je však kalibrační metoda s konkrétně prověřenou recovery, byť nespecifická.

II) Po prvním (1) vyhodnocení byly do dalšího (2) diskvalifikovány výsledky dvou metod (Obr. 6 a 7; BI a MIR-FT) pro velký posun a rozptýl hodnot, nevyhovující recovery a paralyzovaný vztah k ostatním metodám (BI $r = 0,184$ až $0,213$; $P > 0,05$). Protože druhá metoda BI v hodnocení setrvala, jednalo se při diskvalifikaci pravděpodobně o lokální defekt v provedení metody. Přesto postup vykazoval slabší recovery ($75,5 \pm 14,3$ %) a potřebu metodické úpravy podporující věrohodnost výsledků jako zvýšení počtu kalibračních bodů oproti současné metodice. Výsledky metody MIR-FT byly silně systematicky posunuty v důsledku absence zejména laktózy ($33,824 \pm 3,794$ mg/100ml). Přesto korelace k výsledkům dalších relevantních metod byly těsné ($0,991$ až $0,999$; $P < 0,001$). Fotometrická metoda EH vykázala přijatelné hodnoty všech hodnocených ukazatelů věrohodnosti. Nejpriznivějších výsledků v kombinaci všech ukazatelů věrohodnosti dosahovala specifická ureolytická metoda Ureakvant (UR) s měřením difference konduktivity (recovery až $93,2 \pm 10,2$ %; korelace $0,989$ až $1,0$; $P < 0,001$; přijatelný poměr systematické a náhodné složky chyby; HANUŠ et al., 2008 c). Zatímco testované specifické standardní vzorky lze použít pro kontrolu nebo kalibraci všech ostatních metod (BI, EH a UR), není tomu tak u MIR-FT.

Zajištění stanovení VMK mléčného tuku pomocí MIR a MIR-FT

NRL-SM vyvinula postup (HANUŠ et al., 2008 a) přípravy referenční sady vzorků mléka pro kalibraci infraanalyzátorů (MIR a MIR-FT) na měření koncentrace VMK mléčného tuku (BIJGAART, 2006). Jedná se o: - výběr vhodných nativních vzorků mléka (specifikaci plemene a vybraný zdravotní, resp. výživový stav dojníc); - anonymní kontrolu opakovatelnosti výsledků referenční metody stanovení VMK stlukem (ČSN 57 0533); - technologické manipulace s nativními vzorky mléka za účelem zvýšení koncentrace VMK (Obr. 8; HANUŠ et al., 2008 b) pro získání relevantní kalibrační škály. Mechanická indukce lipolýzy a rychlá detekce lipolýzy byly po analytické stránce již dříve popsány (SJAUNJA, 1984; KOOPS et al., 1990).

Výsledek provedené kalibrace MIR-FT je zobrazen na Obr. 9 ($r = 0,929$; $P < 0,001$) a MIR na Obr. 10 ($r = 0,692$ a $0,597$; oba koeficienty $P > 0,05$). Ukazuje se pravidelně, že technologie MIR-FT má lepší předpoklady, tzn. inherentní vlastnosti metody, pro dosažení souladu s referenčními hodnotami (referenční metodou pro VMK) v porovnání k MIR. Výsledek následného výkonnostního testu dva měsíce po kalibraci na sadě vzorků mléka ($n = 10$, manipulace se složkami) ke kalibraci základních složek mléka (tuk, bílkoviny, kasein, laktóza a sušina tukuprostá) je zobrazen na Obr. 11 a v Tab. 1. Další test tři měsíce po kalibraci MIR a MIR-FT na VMK se sadou běžných bazénových nativních vzorků mléka ($n = 10$, bez manipulací složek) je zachycen na Obr. 12. Výsledky prvního výkonnostního testu provedeného pro podporu kvality výsledků analýz VMK jsou relativně dobré. Výsledky druhého testu však naznačují na nějaký specifický metodický problém, který bude muset být, v rámci podpory kvality analytických výsledků, ještě řešen. Soulad dvou shodně, ve stejném termínu (Obr. 11; Tab. 1), nakalibrovaných přístrojů, měřících na stejném principu MIR-FT, je pro ilustraci zachycen na Obr. 13 ($r = 0,96$; $P < 0,001$). Stejně tak vztah výsledků přístrojů měřících na mírně odlišných principech MIR a MIR-FT je na Obr. 14 ($r = 0,82$; $P < 0,01$). Při použití principů MIR a MIR-FT pro měření VMK se však jedná pouze o metody screeningové (BIJGAART, 2006). Na sadě reálných vzorků mléka s menším variačním oborem koncentrací VMK byly však korelace mezi přístroji logicky méně těsné ($r = 0,67$, $0,72$ nebo také $0,85$; HANUŠ et al., 2008 a). Výsledky dokazující dobrou schopnost metody identifikovat a kvantifikovat VMK. Poměrně vysoké korelační koeficienty, dosažené v sadě referenčních

vzorků při kalibrace MIR-FT, byly zčásti výsledkem významně širšího, uměle dosáženého, variačního oboru referenční sady vzorků mléka. Skutečný vztah metody referenční a nepřímé (MIR a MIR-FT) na reálných vzorcích je v případě analýzy této minoritní složky méně těsný. Uvedené dokládají i materiály Foss (2001; $r = 0,90$) k metodě BDI jako referenční. Tato v zahraničí (např. v Nizozemí) poměrně častá metoda poskytuje, jak známo, systematicky mírně nižší výsledky oproti referenční metodě stlукem (ČSN 57 0533), neboť určitá část VMK přechází při postupu do vodné fáze (CVAK et al., 1992).

Uvedenými fakty není řečeno, že hodnoty VMK v nativních vzorcích mléka nemohou být výrazněji zvýšené, podobně jako horní hodnoty použitých referenčních škál. Standardní limit činí $\leq 1,3 \text{ mmol} \cdot 100\text{g}^{-1}$ pro metodu stlукem (ČSN 57 0529; ČSN 57 0533). Jsou nicméně známy případy, kdy jistá stáda dojnic (bazénové vzorky mléka), prokazatelně dlouhodobě trpící horším stavem jejich výživy s ohledem na energetickou složku krmné dávky, opakovaně dosahují jako důsledek hodnot mezi 3,5 až 3,9 $\text{mmol} \cdot 100\text{g}^{-1}$ referenční metodou. Tato skutečnost dokládá, že v případě VMK se jedná o poměrně efektivní ukazatel zdravotního stavu zvířat. Schéma praktického chování VMK v syrovém mléce v důsledku různých biologických, patologických, chemických, fyzikálních, hygienických a technologických faktorů bylo zpracováno na Obr. 15.

Zajištění stanovení ketonů v mléce pomocí MIR-FT a semikvantitativního testu

Za předpokladu platnosti vztahů uvedených v pracích ANDERSSON (1984, 1988), ANDERSSON a LUNDSTRÖM (1984 a, b), ANDERSSON a EMANUELSON (1985) a VOJTÍŠEK (1986) 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 vyvést barevnou nitroprusidovou reakci zamlženou v koloidním roztoku mléka na pevný podklad pro její zvýraznění a zviditelnění. Toho bylo mimo jiné dosaženo precipitací mléčných proteinů na povrchu rekcí směsi reagentie a plnidla s mlékem (JÍLEK, 1999). Aby byl poskytnut efektivní diagnostický prostředek, byl vyvinut mléčný test Ketotest pro usnadnění monitoringu a řízení prevence ketóz. Cílem bylo usnadnit identifikaci subklinické ketózy. Korelace mezi výsledky stanovení ketonů Ketophanem v moči a Ketotestem v mléce identických krav ($n = 76$) činila 0,87 ($P < 0,001$; HANUŠ et al., 1999, 2001 b, c; Obr. 16). Rozdíly hladin acetonu v mléce podle tříd Ketotestu v mléce (ketony) od 0 do 4 byly ve všech kombinacích statisticky vysoce významné ($P < 0,01$) a činily: $4,9 \pm 3,4 \text{ mg/l}$; $10,0 \pm 7,7$; $32,5 \pm 10,9$; $67,2 \pm 23,7$; $111,3 \pm 51,7$. V hodnotách geometrických průměrů to bylo: 4,0 mg/l; 6,3; 30,0; 64,0; 98,9. Výsledky potvrdily dobrou diagnostickou účinnost Ketotestu. Použití operativní semikvantitativní metody může vést při organizaci prevence, případně vhodných nápravných opatření ve výživě, nesporně k podpoře zdravotního stavu dojnic, 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.

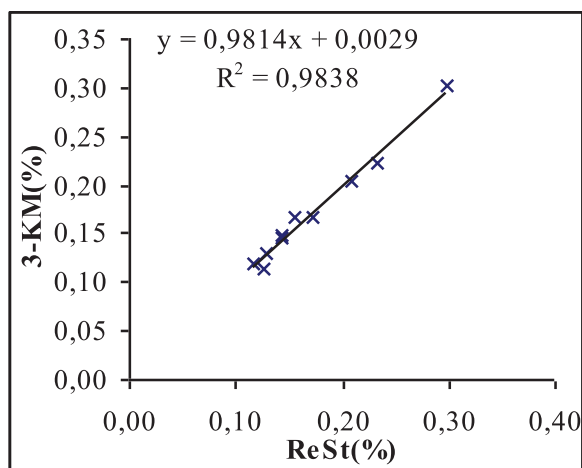
ROOS et al. (2006) hodnotili na základě odečtu acetonu, acetátu a beta-hydroxybutyrátu v individuálních vzorcích mléka pomocí kalibrované infračervené metody MilkoScan FT 6000 (MIR-FT) sensitivitu (70 %), specifitu (95 %) a procento falešně pozitivních (27 %) a falešně negativních (7 %) odečtů s ohledem na schopnost metody k identifikaci stavu subklinické

ketózy dojníc. Použitelnost stádového kontrolního programu je nejvíce ovlivněna citlivostí a pozitivní predikční hodnotou testu stejně jako náklady na test. Výzkum aplikace metody byl označen za ještě vhodný pro praktický monitoring onemocnění. Uvedená čísla by však bylo potřebné zlepšit vývojem účinnější metody. Postup vhodné modifikace kalibrace MIR-FT (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 stále ještě měl být předmětem dalšího výzkumu pro možné zvýšení efektivity. Práce s identifikací acetonu nebo ketózy v mléce pomocí kalibrované infračervené spektroskopie na principu MIR-FT provedli rovněž HANSEN (1999), který zjistil u vzorků kolísajících od 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.

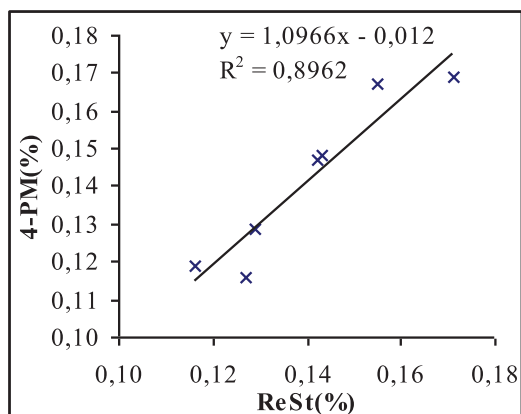
Závěr hodnocení analýz minoritních složek mléka

Ačkoliv je mléko, jako multikomponentní systém, velmi náročné na simultánní nepřímou analýzu složek (zejména z hlediska konstrukce metody a provedení relevantních kalibrací), také pro četné interferenční efekty mléčné matrice (především z hlediska eliminace interference a tzv. „očistění“ signálu), lze v současné době velmi dobře docílit věrohodných výsledků majoritních složek mléka. Slibné (věrohodné a prakticky interpretovatelné) výsledky však mohou zajistit i některé systémy infraanalýzy, především MIR-FT, také u vybraných, prakticky důležitých složek minoritních jako močovina, kyselina citrónová, volné mastné kyseliny nebo popřípadě ketony.

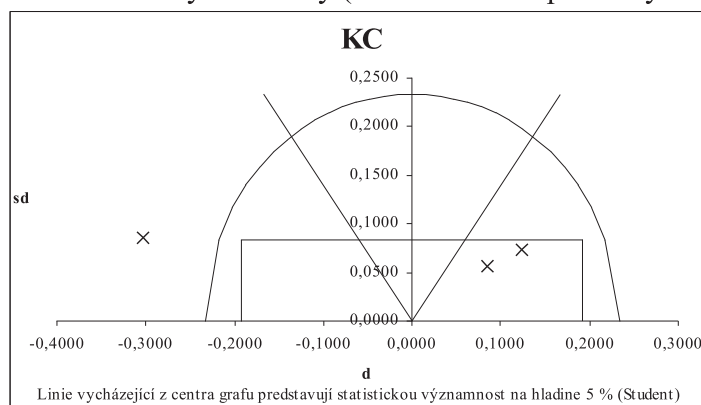
Obr. 1 Regresní vztah mezi výsledky (n = 10) referenční metody (c; ReSt = referenční stanovení) pro určení koncentrace kyseliny citrónové (KC v %) v mléce a metody MIR-FT (3-KM, kontrolní měření).



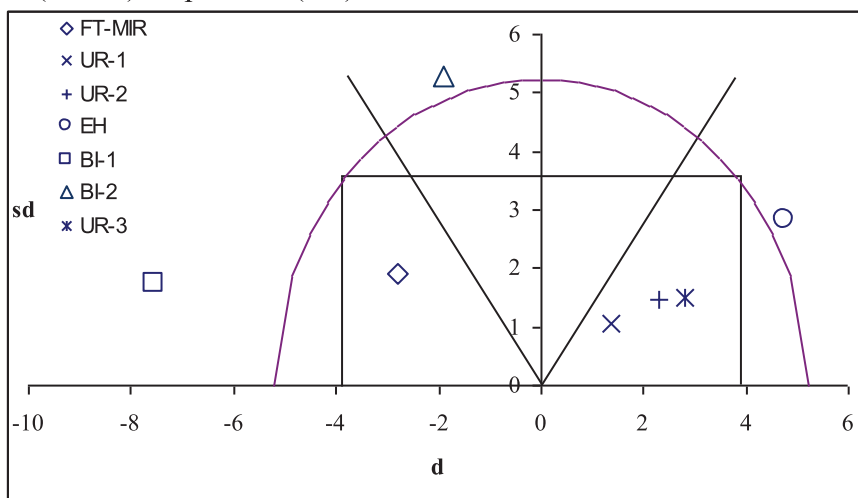
Obr. 2 Regresní vztah mezi výsledky (n = 7) referenční metody (c; ReSt = referenční stanovení) pro určení koncentrace kyseliny citrónové (KC v %) v mléce a metody MIR-FT (4-PM, první měření) pouze pro nativní vzorky mléka.



Obr. 3 Výsledky výkonostního testu MIR-FT pro určení KC s nativními bazénovými vzorky mléka (n = 10) 2 měsíce po provedení experimentální kalibrace s přirozenými a modifikovanými vzorky (s uměle přídavky KC).

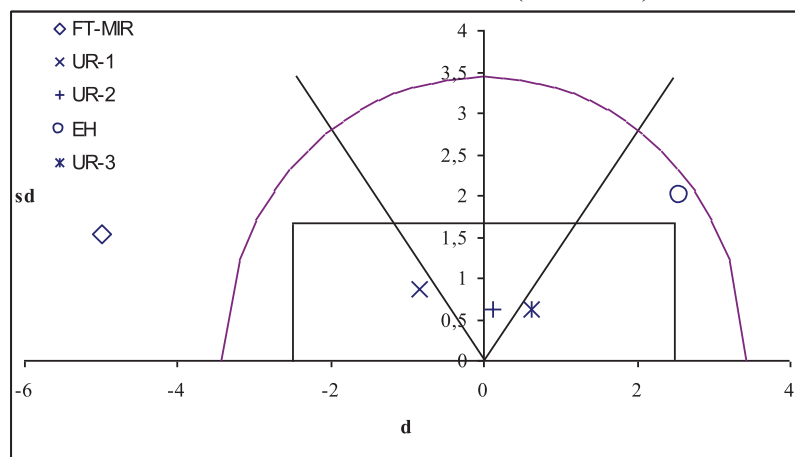


Obr. 4 Euklidická vzdálenost účastníků (I/1; n = 7) stanovení koncentrace močoviny v mléce (KMM) od počátku (RE).

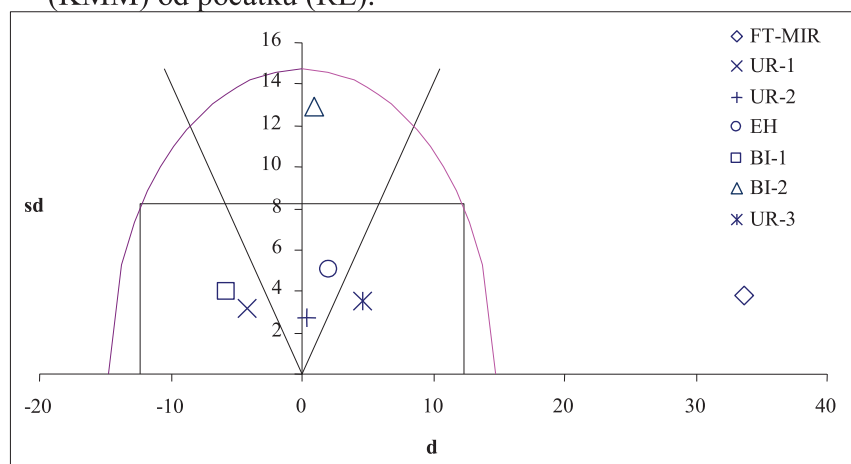


d = průměrná odchylka (diference v mg/100ml); sd = variabilita průměrné difference. Linie vycházející z centra grafu představují významnost odchylek, kdy body pod liniemi jsou významně odchýlené ($P \leq 0,05$), nad liniemi nevýznamně ($P > 0,05$). Půlkruh vymezuje úspěšný výsledek (hladina spolehlivosti 90 % pro RE), obdélník velmi úspěšný výsledek.

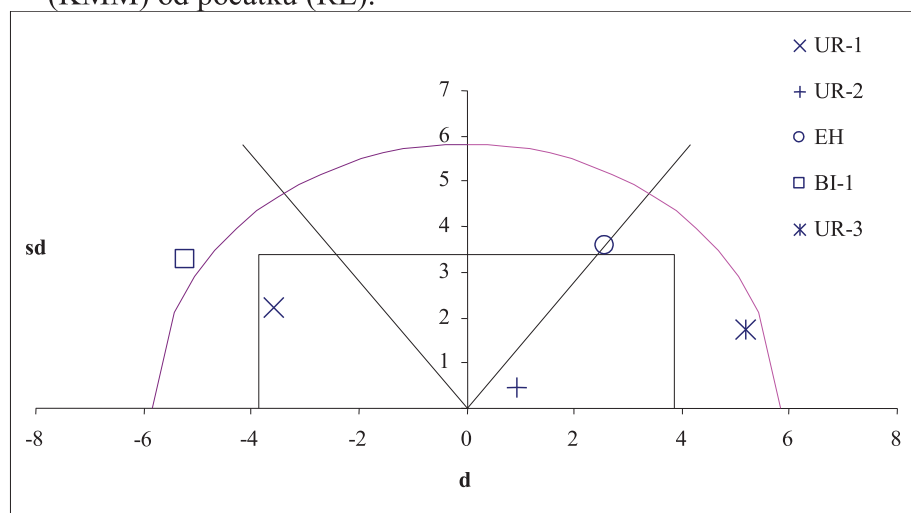
Obr. 5 Euklidická vzdálenost účastníků (I/2; n = 5) stanovení KMM od počátku (RE).



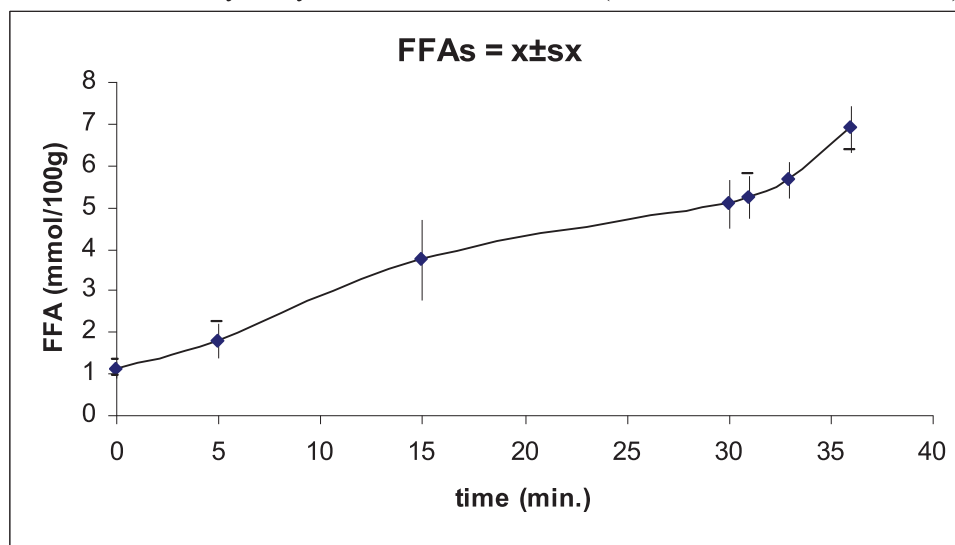
Obr. 6 Euklidická vzdálenost účastníků (II/1; n = 7) stanovení koncentrace močoviny v mléce (KMM) od počátku (RE).



Obr. 7 Euklidická vzdálenost účastníků (II/2; n = 5) stanovení koncentrace močoviny v mléce (KMM) od počátku (RE).

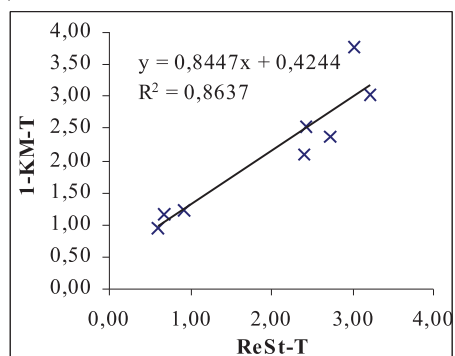


Obr. 8 Grafické vyjádření vlivu intenzity a doby mechanického namáhání mléka na liberalizaci mastných kyselin z mléčného tuku (FFA; HANUŠ et al., 2008 b).

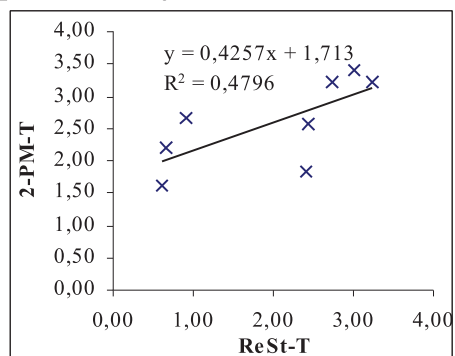


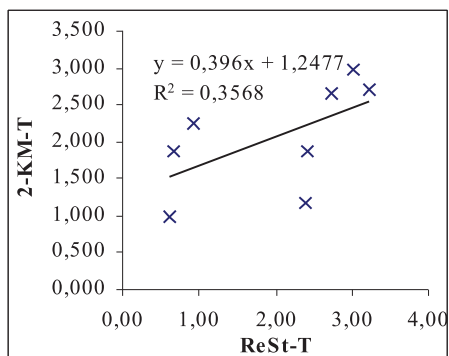
Vzorky mléka ($n = 5$; 0,5 l) byly namáhány mechanicky, mícháním až třístěním v šesti krocích s různými intervaly od nativního mléka: +5, +10, +15 minut (nižší intenzita mechanického stresu; +1, +2 a +3 minuty (vysoká intenzita). Koncentrace volných mastných kyselin mléčného tuku (VMK = FFA) byla stanovena přístrojem Lactoscope FT (MIR-FT; Delta Instruments, Holandsko).

Obr. 9 Výsledek kalibrace MIR-FT (1-KM-T) na určení VMK (mmol/100g) v mléčném tuku (T = tuk; ReSt = referenční stanovení; KM = kontrolní měření kalibrace – validace).

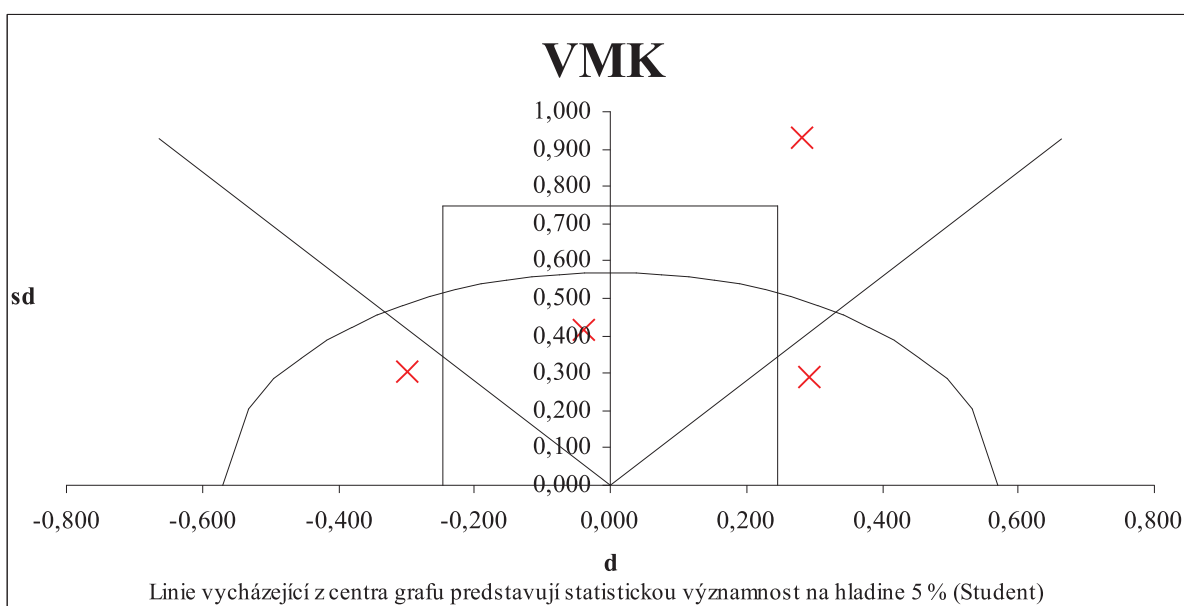


Obr. 10 Výsledek kalibrace MIR (2-PM-T; 2-KM-T) na určení VMK (mmol/100g) v mléčném tuku (T = tuk; ReSt = referenční stanovení; PM = první měření kalibrace = předchozí adjustace; KM = kontrolní měření kalibrace - validace).





Obr. 11 Výsledek výkonnostního testu 2 měsíce po kalibraci nepřímých metod (MIR a MIR-FT) na stanovení VMK na sadě vzorků mléka (n = 10, manipulace se složkami) ke kalibraci základních složek mléka.



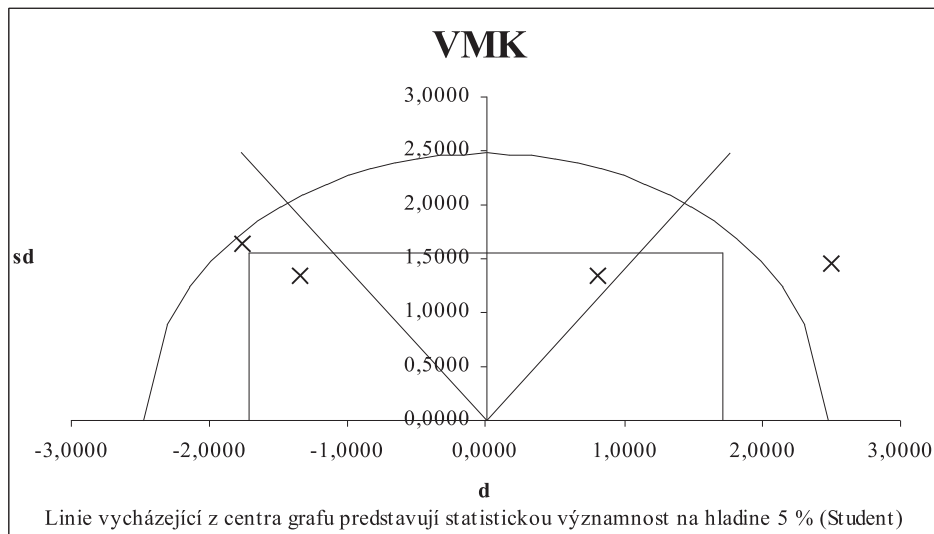
"Půlkruh" znázorňuje 90%ní interval spolehlivosti, resp. diskriminační tlak, pro $r = 0,56971$

Tab. 1 Řazení účastníků výkonnostního testu (MIR (2) a MIR-FT (1, 3 a 4)) stanovení VMK v mléčném tuku (mmol/100g) 2 měsíce po kalibraci na sadě vzorků mléka (n = 10, manipulace se složkami) ke kalibraci základních složek mléka.

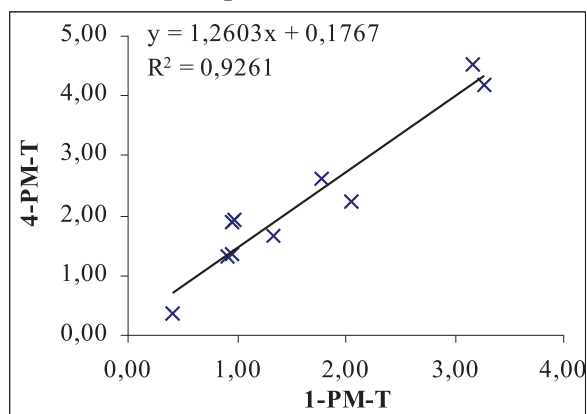
	VMK; difference LAB.-REF.				
	<i>d</i>	<i>sd</i>	<i>RE</i>	<i>t</i>	<i>význ.</i>
4-PM-T	0,29411	0,28791	0,41157	3,23	*
3-PM-T	-0,03849	0,41491	0,41669	0,29	ns
1-PM-T	-0,29749	0,30336	0,42489	3,10	*
2-PM-T	0,28281	0,92885	0,97095	0,96	ns
D	0,2282	0,4838			
sD	0,2459	0,2616			

d = průměrná difference; *sd* = směrodatná odchylka průměrné difference; *RE* = Euklidická distance od počátku; *t* = výsledek párového t-testu; *význ.* = statistická významnost; ns = $P > 0,05$; * = $P \leq 0,05$; *D* = střední hodnota průměrných diferencí; *sD* = její směrodatná odchylka; PM = první měření; T = v tuku; LAB. = hodnota laboratoře (účastníka, přístroje); REF. = referenční hodnota.

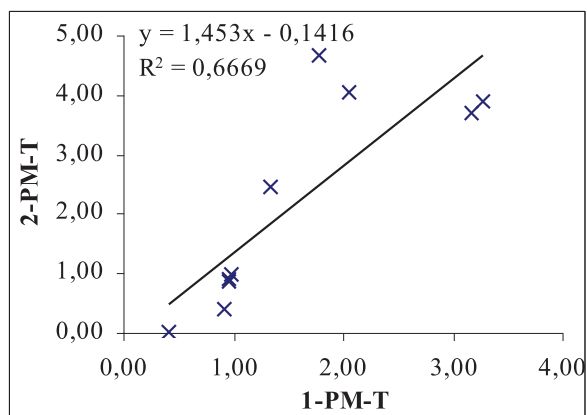
Obr. 12 Výsledek výkonnostního testu 3 měsíce po kalibraci nepřímých metod (MIR a MIR-FT) na stanovení VMK na sadě nativních bazénových vzorků mléka (n = 10, bez manipulací složek).



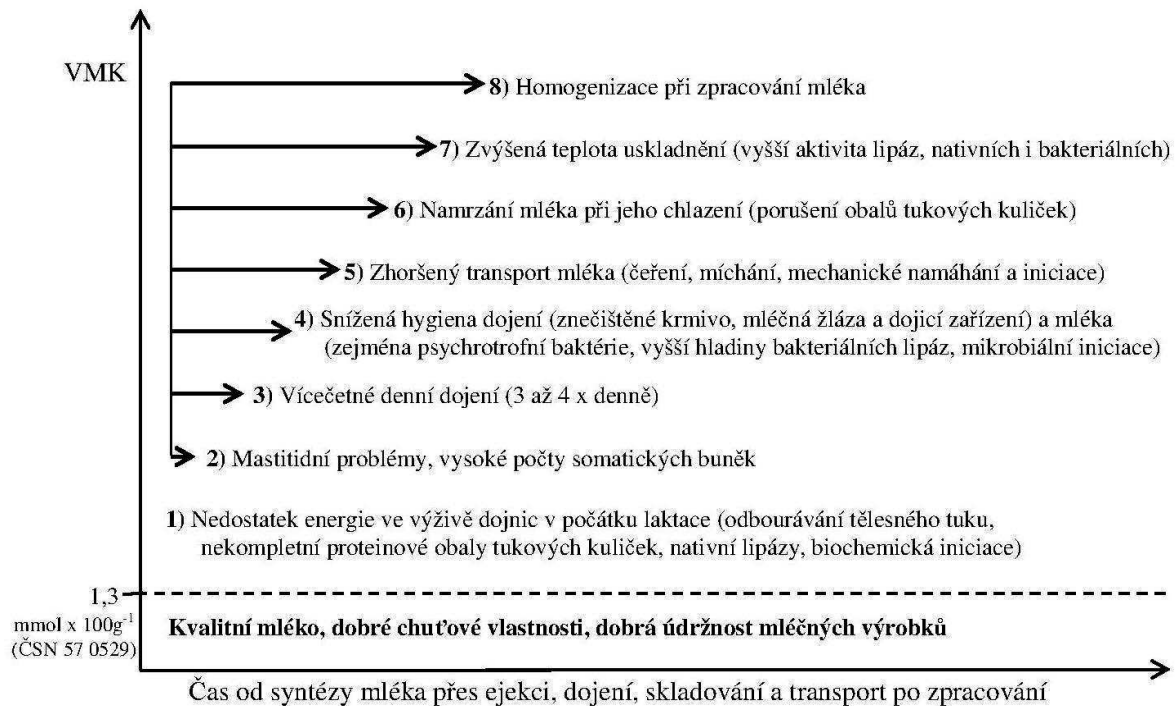
Obr. 13 Vztah výsledků MIR-FT při určení VMK v mléčném tuku 2 měsíce po kalibraci (Obr. 11, Tab. 1; PM = první měření T = VMK v mmol/100g v mléčném tuku).



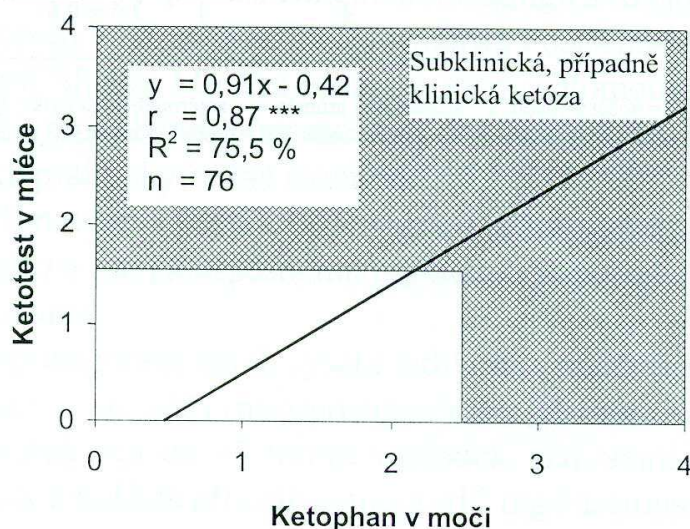
Obr. 14 Vztah výsledků MIR-FT (1) a MIR (2) při určení VMK v mléčném tuku 2 měsíce po kalibraci (Obr. 11, Tab. 1).



Obr. 15 Vzdělání lipolýzy tuku v syrovém mléce, zvýšení obsahu volných mastných kyselin (VMK), ohrožení kvality mléka a výrobků z něho – faktory a jejich kombinace, vztaženo ke zvířeti a technologii (modifikováno podle SJAUNJA (1984), SHELLEY a kol. (1987), O'BRIAN a kol. (1998), VYLETĚLOVÁ a kol. (2000), MA a kol. (2000), ANTONELLI a kol. (2002), SANTOS a kol. (2003), WIKING a kol. (2003, 2006), HANUŠ a kol. (2004, 2008), THOMSON a kol. (2005), FERLAY a kol. (2006), GENČUROVÁ a kol. (2009, 2011), MIKULOVÁ (2011) a HANUŠ a kol., 2013).



Obr. 16 Vztah mezi výsledky stanovení ketonů Ketophanem v moči a Ketotestem v mléce identických krav (n = 76; r = 0,87; P<0,001; HANUŠ et al., 2001 b).



Literární reference

- 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, 1988, 2, 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.
- BAKER, L. D.- FERGUSON, 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.
- BATICZ, O.- TÖMÖSKÖZI, S.- VIDA, L.: Concentrations of citrate and ketone bodies in cow's raw milk. *Periodica Polytechnica, Ser. Chem. Eng.*, 46, 1 – 2, 2002, 93-104.
- BIJGAART VAN DEN, H.: New applications of mid-infra-red spectrometry for the analysis of milk and milk products. 2 Free fatty acids. *IDF Bulletin*, 406, 2006, 22-28.
- BROUTIN, P. J.: New applications of mid-infra-red spectrometry for the analysis of milk and milk products. 1 Casein. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 406, 2006 a, 2-21.
- 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 b.
- 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 2000, Slovenia*.
- 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.
- COVENEY, L.: Milk testing proficiency scheme, Round 26 – November 2001. Example laboratory, Savant Technologies, 2001, 12.
- CVAK, Z.- PETERKOVÁ, L.- ČERNÁ, E.: *Chemické a fyzikálně-chemické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků*. VÚP, Milcom servis a.s. Praha, ISBN 80-85120-36-4, 1992, (118), 222.
- ČSN 57 0533: Mléko – stanovení látkového obsahu volných mastných kyselin. Milk – determination of free fatty acids (In Czech) ČNI Praha, 1997.
- ČSN 57 0536: Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátořem. Determination of milk composition by mid-infrared analyzer. (In Czech) Český normalizační institut, Praha, 1999.
- ČSN 57 0529: Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetřeni a zpracování. Raw cow milk for dairy factory treatment and processing. (In Czech) Praha, ČNI, 1993.
- ČSN EN ISO/IEC 17025: Posuzování shody - Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoři. Conformity assessment - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ČNI Praha, 2005.
- ECKSCHLAGER, K.: *Chyby chemických rozborů*. 1961, Praha, SNTL, 163.
- ECKSCHLAGER, K.- HORSÁK, I.- KODEŠ, Z.: *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*. 1980, Praha, SNTL.

- ERBERSDOBLER, H. F.- ECKART, K.- ZUCKER, H.: 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, 1980.
- ENJALBERT, F.- NICOT, M. C.- BAYOURTHE, C.- MONCOULON, R.: Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationships between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *J. Dairy Sci.*, 84, 2001, 583-589.
- FEINBERG, M.- LAURENTIE, M.: A global approach to method validation and measurement uncertainty. *Accred. Qual. Assur.*, 11, 2006, 3-9.
- 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 6000; Free fatty acids measurement (FFA). Spectrum Calibration. Foss Electric. 2001, 1-8.
- FOSS: MilkoScan FT 120; Improved milk calibration. Foss Analytical Application Note No. 128e, November 2004, P/N 580282, 1-14.
- FUCHS, M.: Der AFEMA-Sternstest: ein Beitrag zur internationalen Harmonisierung der Rohmilchanalytik. XXVIII Óvári Tudományos Napok, Mosonmagyaróvár 2000, 71-75.
- GARNSWORTHY, P. C.- MASSON, L. L.- LOCK, A. L.- MOTTRAM, T. T.: Variation of milk citrate with stage of lactation and de novo fatty acid synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 2006, 1604-1612.
- GOLC-TEGER, S.: Zagotavljanje kakovosti analiz v mlekarskih laboratorijih = Analytical quality assurance in dairy laboratories. V: 1. slovenski mednarodni kongres Mleko in mlečni izdelki, Portorož, Slovenija, 20. - 22. September 1995. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, 1996, 279-283.
- GOLC-TEGER, S.: Slovenia in the European network of dairy laboratories. V: 5th International Symposium "Animal Science Days", Opatija, 23. - 26. September 1997. *Animal science days, Agriculturae Conspectus Scientificus*, 62, 1997, 37-40.
- GOLC-TEGER, S.- POGAČAR, J.- VALINGER, E.: The Slovenian dairy laboratories proficiency testing scheme. V: Analytical quality and economic efficiency in dairy food laboratories: abstracts. Sonthofen, International Dairy Federation (IDF), AOAC International, German Dairy Association, 1996, 3.
- GRAPPIN, R.: Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis - application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Doc. 208, IDF Provisional Standard 128, 1987, 3-12.
- GRAPPIN, R.: 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 1993, 205-211.
- 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.
- GUSTAFSSON, A. H.- EMANUELSON, U.: Milk acetone as indicator of hyperketonaemia in dairy cows - the critical value revised. *EAAP Congr. Aarhus, Denmark*, 1993, 443.
- GUSTAFSSON, A. H.- PALMQUIST, D. L.: Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low recoverys. *J. Dairy Sci.*, 76, 1993, 475-484.
- HANSEN, P. W.: Screening of dairy cows for ketosis by use of infrared spectroscopy and multivariate calibration. *J. Dairy Sci.*, 82, 1999, 2005-2010.
- 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, 3, 1994, ISSN 0139-7265, 25-41.

- HANUŠ, O.- BEBER, K.- FICNAR, J.- GENČUROVÁ, V.- GABRIEL, B.- BERANOVÁ, A.: Vztahy mezi kysací schopností bazénového kravského mléka, jeho složením a obsahem některých metabolitů. Relationship between the fermentation of bulk milk sample, its composition and contents of some metabolites. *Živočišná Výroba*, 1993 a, 38, 7, 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. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. (Brno)*, ISSN 1211-8516, 1998, XLVI, 3, 33-53.
- HANUŠ, O.- FICNAR, J.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- BERANOVÁ, A.- HAVLÍČKOVÁ, K.: A retrospective study of results and evolution of methodical design for preparation of urea milk calibration standard sets. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu*, 2, 1997, ISSN 0139-7265, 7-21.
- 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 c, 38, 1, 61-72.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- MOTYČKA, Z.- ČERNOCKÝ, M.: Interpretace výsledků experimentální kalibrace rutinních IR přístrojů pro měření látkového obsahu volných mastných kyselin (VMK) mléčného tuku. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, L, 182, 2, 2008 a, ISSN 0139-7265, 55-62.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- PONÍŽIL, A.- HLÁSNÝ, K.- GABRIEL, B.- MÍČOVÁ, Z.: Vliv ročního období, přídatku 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. *Živočišná Výroba*, 38, 8, 1993 b, 753-762.
- HANUŠ, O.- HERING, P.- FRELICH, J.- JÍLEK, M.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.: Reliability of milk urea analyse results by various methods in use of artificial milk control samples. *Czech J. Anim. Sci.*, 53, 4, 2008 c, 156-165.
- HANUŠ, O.- HLÁSNÝ, J.- TRAJLÍNEK, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Výsledky vyšetření dojníc 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. *Nové trendy v organizačních, technologických a hygienických postupech nákupu syrového mléka v kontextu podmínek EU: sborník referátů OAK Šumperk*, 2001 b, 88-90.
- HANUŠ, O.- JÍLEK, M.- FICNAR, J.- BERANOVÁ, A.- JEDELSKÁ, R.- HAVLÍČKOVÁ, K.- MÍČOVÁ, Z.: Ways of preparing standards for calibration of indirect methods of determination of urea concentration in milk. (In Czech) *Živočišná Výroba*, 40, 10, 1995, 441-451.
- HANUŠ, O.- KVPILÍK, J.- KLOPČIČ, M.- ŘÍHA, J.- BJELKA, M.: Predictive model estimating economic impacts associated with long-term metabolic N-overload or N-underload in dairy cows. (In Czech) In III. International scientific conference AGROREGION 2000: Proceedings, České Budějovice, 2000, 83-86.
- HANUŠ, O.- SKYVA, J.- HOFBAUER, J.- KLOPČIČ, M.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.: Reliability of analytical methods applicable at milk urea determination. (In Czech) *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. (Brno)*, XLIX, 3, 2001 a, 143-154.
- 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. *Výzkum v chovu skotu*, 4, 1999, ISSN 0139-7265, 17-34.
- HANUŠ, O.- TRAJLINEK, J.- HLÁSNÝ, J.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.:

- Problematika ketóz, jejich diagnostiky a monitoringu. Ketosis problem, its diagnostic and monitoring. Chov a šlechtění skotu pro konkurenceschopnou výrobu: sborník referátů VÚCHS Rapotín, 2001 c, 105-113.
- HANUŠ, O.- VEGRICHT, J.- FRELICH, J.- MACEK, A.- BJELKA, M.- LOUDA, F.- JANŮ, L.: Analyse of raw cow milk quality according to free fatty acids contents in the Czech Republic. Czech J. Anim. Sci., 53, 1, 2008 b, 17-30.
- HERRE, A.: Den Harnstoff-Werten nicht blind vertrauen! Top Agrar, 2, 1998: R10.
- 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.
- HEUER, C.- LUINGE, H. J.- LUTZ, E. T. G.- SCHUKKEN, Y. H.- MAAS VAN DER, J. H.: Determination of acetone in cow milk by Fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. J. Dairy Sci., 84, 2001, 575-582.
- 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.
- ILLEK, J.- PECHOVÁ, A.: Poruchy metabolismu dojníc a kvalita mléka. Metabolic disorders at cows and milk quality. Farmář, 6, 1997, 29-30.
- JANKOVSKÁ, R.- ŠUSTOVÁ, K.: Analysis of cow milk by near-infrared spectroscopy. Czech J. Food Sci., 21, 2003, 4, 123-128.
- JÍLEK, M.: osobní sdělení, 1999 a 2008.
- 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, 2006, 12, 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.
- KERKHOF MOGOT M. F.- KOOPS, J.- NEETER, R.- SLANGEN, K. J.- HEMERT VAN, H.- KOOYMAN, O.- WOOLDRİK, H.: Routine testing of farm tank milk with the Milko-Scan 203. 1. Calibration procedure and small-scale experiments. Neth. Milk Dairy J., 36, 1982, 115-130.
- KHALED, N. F.- ILLEK, J.- GAJDŮŠEK, S.: Interactions between nutrition, blood metabolic profile and milk composition in dairy goats. Acta Vet. Brno, 68, 1999, 253-258.
- KIRCHGESSNER, M.- KREUZER, M.- ROTH, MAIER, DORA, A.: Milk urea and protein content to diagnose energy and protein malnutrition of dairy cows. Arch. Anim. Nutr., 36, 1986, 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.
- KOOPS, J.- KLUMP, H.- HEMERT VAN, H.: Rapid enzymatic assay of free fatty acids (lipolysis) in farm tank milk by a segmented continuous-flow method. Comparison of the results with those obtained by the BDI procedure. Neth. Milk Dairy J., 44, 1990, 3-19.
- KRÁČMAR, S.- JANKOVSKÁ, R.- ŠUSTOVÁ, K.- KUČTÍK, J.- ZEMAN, L.: Analysis of amino acid composition of sheep colostrum by near-infrared spectroscopy. Czech J. Anim. Sci., 49, 2004, 5, 177-182.
- KUBEŠOVÁ, M.- FAJMON, T.- FRELICH, J.- TRÁVNÍČEK, J.- MARŠÁLEK, M.: Analysis of milk urea and milk citrate content during the postpartal period and their impact on reproduction in dairy cows. Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, 1, 2009, ISSN 0139-7265.

- KUKAČKOVÁ, O.- ČURDA, L.- JINDŘICH, J.: Multivariate calibration of raw cow milk using NIR spectroscopy. *Czech J. Food Sci.*, 18, 1, 2000, 1–4.
- KUPKA, K.: *Statistické řízení jakosti*. TriloByte. ISBN 80-238-1818-X, 1997, 119.
- 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. 2099/E.
- LEFIER, D.- GRAPPIN, R.- POCHE, S.: Determination of fat, protein, and lactose in raw milk by Fourier transform infrared spectroscopy and by analysis with a conventional filter-based milk analyzer. *Journal of AOAC*, 79, 3, 1996, 711-717.
- LERAY, O.: CECALAIT: an organization to support analytical quality assurance in dairy laboratories. V: *Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories*. Sonthofen / Germany, 1992 -05-18/20, Brussels, 1993, 349-360.
- MELOUN, M.- MILITKÝ, J.: *Statistické zpracování experimentálních dat na osobních počítačích*. Statistical processing of experimental data by personal computer. Díl IIA, Pardubice 1992, 102.
- MELOUN, M.- MILITKÝ, J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Plus spol. s r.o., 1994.
- OLTNER, R.- BENGSSON, S.- LARSON, K.: Flow injection analysis for the determination of urea in cows milk. *Acta Vet. Scand.*, 26, 1985, 396-404.
- 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.
- SJAUNJA, L. O.: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. III. The effect of different treatments on infrared analyses. *Acta Agric. Scand.*, 34, 1984, 273-285.
- SUCHÁNEK, M.- PLZÁK, Z.- ŠUBRT, P.- KORUNA, I.: *Kvalimetrie, 7. Validace analytických metod*. Eurachem, 1999, 140.
- ŠUSTOVÁ, K.- KUČTÍK, J.- KRÁČMAR, S.: Analysis of ewe's milk by FT near infrared spectroscopy: measurement of samples on Petri dishes in reflectance mode. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LIV, 2006, 2, 131-138.
- ŠUSTOVÁ, K.- RŮŽIČKOVÁ, J.- KUČTÍK, J.: Application of FT near spectroscopy for determination of true protein and casein in milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 52, 9, 2007, 284–291.
- TSENKOVA, R.- ATANASSOVA, S.- ITOH, K.- OZAKI, Y.- TOYODA, K.: Near infrared spectroscopy for biomonitoring: Cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers. *J. Anim. Sci.*, 78, 2000, 515–522.
- UNGLAUB, W.: Untersuchung zur Bestimmung und zum Gehalt des Azeton in Milch. *Tierärztl. Umsch.*, 1983, 534-543.
- VOJTÍŠEK, B.: Stanovení acetonu v mléce, mlezivu, krvi a moči dojníc mikrodifúzní metodou. The determination of acetone in milk, colostrum, blood and urine of dairy cows by microdiffusion method. *Veterinářství*, 36, 1986, 9, 394-396.
- VYLETĚLOVÁ, M.- FICNAR, J.- HANUŠ, O.: Effects of lipolytic enzymes *Pseudomonas fluorescens* on liberation of fatty acids from milk fat. (In Czech) *Czech J. Food Sci.*, 18, 5, 2000 a, 175-182.
- VYLETĚLOVÁ, M.- HANUŠ, O.- URBANOVÁ, E.- KOPUNECZ, P.: The occurrence and identification of psychrotrophic bacteria with proteolytic and lipolytic activity in bulk milk

samples at storage in primary production conditions. (In Czech) Czech J. Anim. Sci., 45, 2000 b, 373-383.

WOOD, R.: Proficiency testing and accreditation of food analysis Laboratories. 1. Conference on practical application of European legislation on foodstuffs. Bled, Slovenia 1994-10-517, Ljubljana, 1994, 55-65.

WOOD, R.- NILSSON, A.- WALLIN, H.: Role of proficiency testing in the assessment of laboratory quality. In Quality in the food analysis laboratory. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1998, 172-202.

C) Mléko jako zdroj informací ke ketóze, zejména subklinické

Ketóza jako produkční porucha, tedy porucha energetického metabolismu, je u vysokoprodukčních dojnic rizikovým faktorem dojivosti, kvality mléka a ohrožením jejich reprodukce i života. Je důležité, avšak ne jednoduché, včas rozlišit její subklinickou formu. Podle dřívějších výsledků stanovení prahových hodnot ukazatelů ketózy, tedy zejména acetonu a tukových (ketózních) kvocientů syrového kravského mléka, lze, pro průběžnou identifikaci subklinické ketózy v kontrole užitkovosti nebo u real time analytických měřicích systémů v prvovýrobě mléka, zlepšit odhady těchto prahových identifikačních hodnot pro prevenci produkčních poruch dojnic a podporu jejich reprodukce a zdraví.

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. Tuk v mléce se tak může nejdříve zvýšit (Tab. 1 a 2) s pokračováním ketózy může pak klesat. Tento jev může vést až k poklesu metabolické funkce jater jejich infiltrací tukem (syndróm lipomobilizace až jaterní steatózy) nebo jaternímu kómatu. Zde je důležitou vlastností regenerační schopnost jater. Průběžně dochází právě ke vzrůstu obsahu ketonových látek v tělních tekutinách (Tab. 1).

Obsah ketolátů (acetonu (AC), 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.

Tab. 1 Vliv některých produkčních onemocnění na složení a vlastnosti mléka (podle FAMIGLI BERGAMINI, 1987)

Porucha	Produkce	Tuk	Bílkoviny	Kasein	Laktóza	Ketony - aceton	Močovina	Sušina tukuprostá	Somatické buňky	Titrační kyselost
Acidóza	↑ ↓	↓ ↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↑
Alkalóza	↓	↓	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓	↑	↑ ↑	↓	↑	↓
Ketóza	↓ ↓	↓ ↑	↓	↓	↓ ↓	↑ ↑	↑	↓	↑	↑
Mastitida	↓	↓ ↑	↓ ↑	↓	↓			↓	↑ ↑	↓
Stres		↓	↓							↑

Tab. 2 Praktická interpretace poměru obsah tuku/obsah bílkovin (T/B) v mléce (modifikováno podle: AGABRIEL et al., 1991, 1992; BÍRO et al., 1992; FÜRLL et al., 1992; GEISHAUSER a ZIEBELL, 1995; SCHULZ, 1997; GASTEINER, 2000)

- ve vztahu k fyziologii výživy dojnic (individuální vzorky mléka):			
	nízký T/B	vyhovující T/B	vysoký T/B
- pro holštýnské dojnice	< 1,05	1,05 – 1,18	> 1,18
- kombinovaná a mléčná plemena (Německo)	< 1,1 nedostatek strukturní vlákniny v krmné dávce	1,1 – 1,6	> 1,6 nedostatek energie, riziko ketózy
- ve vztahu k sýrařské technologii (bazénové, resp. cisternové vzorky mléka):			
- ve Francii, mléko obecně	< 1,10	1,10 až 1,20 1,14 až 1,18 nejlepší technologická hodnota	> 1,20

Zvýšený aceton v mléce, jako projev ketózy, snižuje dojivost (o 2 až 9 % při subklinické ketóze a až o 26 % při ketóze klinické; MIETTINEN, 1994) a reprodukci. Prodlužuje servis periodu až o 20 dní (ŘÍHA a HANUŠ, 2000; P < 0,05). Také WALDMANN et al. (2003) předpověděli vzrůst pravděpodobnosti opakované inseminace při vzrůstu koncentrace acetonu v mléce při inseminaci a BERAN et al. (2012) našli vztah mezi nejvyššími hodnotami acetonu v mléce a cervikálním hlenem a přežitím spermií během krátkodobého tepelného stresu, které bylo negativně ovlivněno, což činí spermie citlivějšími k vlivům prostředí a může tak snížit jejich oplodňovací efektivitu.

Prevence je významná, protože výskyt ketóz v problémových stádech může být v 1. 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). 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 přidávků různých glukoplastických nebo hepatoprotektivních látek (jako propylenglykol, monensin, *Silybum marianum*) do krmných dávek krav.

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 ± 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 dojnic.

Vzhledem k charakteru průběhu ketózního onemocnění dojnic 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 dojnic, 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, inzulínu atp., SAKAI et al., 1993). Je důležité vést o výsledcích monitoringu ketóz a provedených opatření včetně jejich účinnosti pravidelné záznamy.

Význam ketonů (acetonu) v mléce

Koncentrace ketonů, resp. acetonu (AC) v mléce je dobrým indikátorem ketóz (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). Podle AC lze úspěšně kontrolovat negativní energetickou bilanci (NEB) krav. NEB je rizikové období v počátku laktace, zpravidla s vyšším AC v mléce.

Aceton v krvi a mléce je vysoce korelovan (r = 0,96; ENJALBERT et al., 2001). U krav s vyšším mléčným AC ve druhém a třetím měsíci laktace ($> 0,25$ mmol.l⁻¹) 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). Proto vysoký obsah acetonu v mléce indikuje labilní látkovou výměnu u krav. Významným vlivem na obsah acetonu v mléce je však i kvalita siláží, které jsou významně ketogenním krmivem. 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. Bylo tak doporučeno zařazení obsahu AC v mléce jako ukazatele energetické bilance do sledování KU. Genetické (plemenné) faktory subklinické a klinické ketózy a hladiny mléčného AC byly také řešeny (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 dojnicemi bylo tak doporučeno vícekrát (DIEKMANN, 1987; GRAVERT et al., 1986, 1991).

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). Subklinická ketóza byla často definována jako propad mléčné užitkovosti nebo ztráta tělesné kondice (GUSTAFSSON a EMANUELSON, 1993; HANUŠ et al., 1999; HEUER et al., 1999; GASTEINER, 2003). Diagnostická hladina AC v mléce není v literárních zdrojích stále přijatelně sjednocena. Pohybuje se od 2 do 41 mg.l⁻¹ (od 0,03 do 0,7 mmol.l⁻¹; GUSTAFSSON a EMANUELSON, 1993;

GRAVERT et al., 1986; HANUŠ et al., 1999; MIETTINEN, 1995; GASTEINER, 2000). 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, 1997; 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 používány hranice zcela ostré, v praxi vyhovují zamýšlenému účelu. Určení diskriminačního (diagnostického prahu) limitu AC v mléce pro subklinickou ketózu se tedy nejčastěji pohybovalo kolem 10 mg.l⁻¹. Vyšší hladiny AC byly také spojeny se zhoršením technologické zpracovatelnosti mléka (HANUŠ et al., 1993).

Metody stanovení acetonu v mléce v praxi

Stanovení mléčného acetonu je prováděno nejčastěji metodami fotometrickými, stájovými semikvantitativními kolorimetrickými testy na nitroprusidové bázi a nepřímou metodou infračervené spektroskopie. Korelace mezi výsledky stájových testů Ketophanu v moči a Ketotestu v mléce činila 0,87 (P < 0,001; HANUŠ et al., 2001 c). 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 identifikaci ketózy na základě odečtu acetonu, acetátu a beta-hydroxybutyrátu v individuálních vzorcích mléka pomocí kalibrované infračervené metody MSc FT 6000 (MIR-FT) jako uspokojivou, podobně HANSEN (1999).

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. HEUER et al. (2001) zjistili 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).

Ketóza a ostatní složky mléka a jejich indikační způsobilost

Byl nalezen pozitivní korelační koeficient ($r = 0,30$; $P < 0,001$; HANUŠ et al., 2004 a) mezi log koncentrace AC a koeficientem tuk/bílkoviny v kravském mléce, jako dalším ukazatelem energetického metabolismu krav (Tab. 2). Tento potvrzoval uvedenou vypovídací schopnost obou ukazatelů ve vazbě na trendy naznačené v Tab. 1 a 2. Vhodnost dalších mléčných ukazatelů, tuk/bílkoviny (T/B) a tuk/laktóza (T/L), tzv. mléčných ketzních nebo energetických koeficientů, jako ukazatelů subklinické ketózy, byla hodnocena v řadě prací (GEISHAUSER a ZIEBELL, 1995; STEEN et al., 1996; DUFFIELD et al., 1997; GEISHAUSER et al., 1997; REIST et al., 2002; VAN KNEGSEL et al., 2010; SIEBERT a PALLAUF, 2010; HANUŠ et al., 2011 b; MANZENREITER et al., 2013). Převážně bylo poukázáno na praktickou způsobilost zmíněných koeficientů k indikaci subklinické ketózy za předpokladu zohlednění některých vlivných faktorů, jako je např. plemeno dojníc a stadium laktace.

Potřeba pravidelné indikace výskytu ketózy v mléčných stádech

LESLIE (1999) uvedl, 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.

HEUER et al. (2000 b) provedli ověření přesnosti predikce vícenásobného regresního modelu pro odhad energetické bilance vysoceužitkového stáda dojnic od 2. do 12. týdne laktace. Do tohoto modelu zahrnuli kontrolu dojivosti a tělesné kondice dojnic (podobně také DUCHÁČEK et al., 2012), test ketonů, obsah tuku, bílkovin a laktózy z kontroly užitkovosti a poměr tuk/bílkoviny. Závěrem uvedli, že informace z testovacího dne KU bez testu hladiny ketonů a skóre tělesné kondice je dostačující pro odhad průměrné energetické bilance stáda s tím, že velikost stáda limituje správnost předpovědi.

Se sofistikovaným rozvojem rutinních analytických možností mléčných laboratoří KU a výzkumem vzájemných vztahů mléčných ukazatelů a jejich vztahů ke zdraví zvířat lze rozšiřovat i spektrum služeb chovatelům mléčného skotu. Uvedené může mít podobu rozšíření spektra prováděných analýz a vývoje interpretačního software k řízení prevence produkčních poruch krav, snižování ztrát na dojivosti, zlepšování jejich zdravotního stavu a kvality produkovaného mléka.

D) Rozšíření analytického portfolia metody MIR-FT pro monitoring produkčních poruch dojnic a jeho pravděpodobnostní metody, Ketosis Report

Zásadním faktorem možného vývoje rutinních identifikačních metod subklinických ketóz ve vzorcích mléka se v poslední době stal výzkum a vývoj měřicích schopností metody MIR-FT. Sofistikovaným vývojem hardware a software byly docíleny konstrukce přístrojů schopné efektivně (rychle, s přijatelnou věrohodností výsledků a za přijatelnou cenu) měřit řadu mléčných složek, majoritních i minoritních a vlastností mléka. Také odhady diskriminačních limitů mléčných ukazatelů s ohledem na subklinickou ketózu přispěly k tomuto vývoji otevřením možností pro konstrukce výsledkově-interpretačního software. Tyto snahy vyústili v návrh interpretačního protokolu Ketosis Report.

BROUTIN (2016) naznačil řadu tradičních (mléko) i netradičních (krev) možných způsobů kalibrace metody MIR-FT (Bentley Instruments) na měření různých forem ketonů v mléce (AC, BHB). Zároveň naznačil možné vazby variability mastných kyselin (MK) mléčného tuku (palmitová (16:0), stearová (18:0), olejová (18:1), nasycené MK, nenasycené MK, mononenasycené a polynenasycené MK) s ketózou a možnosti MIR-FT k jejich identifikaci v mléce. Tato kombinace by mohla zpřesnit identifikace subklinických ketóz z individuálního mléka v kontrole užitkovosti. Doporučil tak multi-dimensionální přístup ke zlepšení identifikace subklinických ketóz. Tím učinil z metody MIR-FT jeden z nejdůležitějších budoucích nástrojů monitoringu a možné redukce ketóz v praktických podmínkách chovů vysoceužitkových dojnic (příloha metodiky 1).

Na zmíněný pohled navázal ŘÍHA (2016) rozpracováním a uvedením představy tohoto multi-dimensionálního přístupu na bázi pravděpodobnostního odhadu návrhem statistických a diskriminačních principů a algoritmů identifikace subklinických ketóz podle výsledků skladby mléka měsíčních individuálních vzorků kontroly užitkovosti (Bentley Instruments). Tabulkové výstupy Ketosis Report odhalují pravidelně možný výskyt subklinických a klinických ketóz ve vysoceužitkových stádech dojnic v první třetině jejich laktace. Dalším pohledem zde zahrnutým je klouzavá kontrola časové dynamiky charakteristik a parametrů variability těchto ketóz ukazatelů konkrétního stáda a jejich průběžné srovnání s respektovanými, resp. definovanými limity. Z hlavních mléčných a ketóz ukazatelů Ketosis Report jsou zahrnuty (příloha metodiky 2): aceton; BHB; dojivost; kyselina olejová; tuk/bílkoviny; tuk/laktóza; tuk/ další mléčné ukazatele; atd. Ke zlepšení informační hodnoty odhadů identifikace ketóz je v protokolu pravidelně generována korelační matice aktuálních vztahů mezi mléčnými ukazateli. Z obsažnosti protokolu je zřejmé, že jeho implementace do

praxe si vyžádá četná odborná školení a také určitý čas interpretace v praxi samotnými chovateli dojníc pro dosažení maximální informační efektivity.

2) Cíle certifikované metodiky Ketosis Report

Obecným cílem certifikované metodiky je přispět ke zlepšení kontroly zdraví dojníc, kvality syrového mléka, provozní jistoty chovatelů krav a podpořit bezpečnost mléčného potravinového řetězce zlepšením aplikace informačních technologií a vyšší efektivitou využití v datech zakódované informace.

Konkrétním cílem vlastní certifikované metodiky tedy je:

- **uvést validované možnosti aplikace nepřímé metody MIR-FT pro stanovení ketonů a dalších relevantních analytů (složek a vlastností)** v individuálních vzorcích mléka v kontrole užítkovosti pro jednu z možných forem indikace subklinické ketózy;
- **uvést validované možnosti aplikace nepřímé metody MIR-FT a potvrzení dalších analytických možností** a rozšíření analytického spektra této metody po předchozím vývoji hardware i software ke kontrole složení, vlastností a tedy kvality mléka;
- **shrnout praktické aspekty interpretace výsledků acetonu, ketózních složkových koeficientů a ostatních ukazatelů (metabolitů) v mléce s ohledem na monitoring subklinických ketóz dojníc** a možnosti prevence problémových situací ve výživě dojníc a jejich případných produkčních poruch (energetického deficitu (NEB), resp. ketóz) prostřednictvím protokolu Ketosis Report s novou vyšší informační efektivitou.

Tato metodika navazuje systematicky a metodicky na výsledky předešlého vývoje metod identifikace ketózy, tedy certifikovanou metodiku RO0513 CM 24.

3) Vlastní výzkum a vývoj pro certifikovanou metodiku – validace vybraných možností analytických metod a spolehlivosti indikačních dat (cut-off limits) o složení a vlastnostech kravského mléka v kontrole užítkovosti s ohledem na subklinickou ketózu

A) Stanovení acetonu v mléce fotometricky po mikrodifúzi a pomocí infračervené spektroskopie FT

Aceton (AC) a betahydroxybutyrát (BHB) v mléce jsou významné ukazatele energetického metabolismu krav ke kontrole případného výskytu ketózy. K takovému praktickému monitoringu je třeba vhodná efektivní metoda s věrohodnými výsledky. Cílem této práce bylo ověřit možnosti moderní infračervené metody MIR-FT ve smyslu její kalibrace ke stanovení AC v mléce a vyvinout prakticky použitelný postup (HANUŠ et al., 2011 a). Jako referenční (Re) byla použita mikrodifúzní fotometrická (485 nm; Spekol 11) metoda se salicylaldehydem, jako nepřímá metoda byla středová infračervená spektroskopie FT (MIR-FT: Lactoscope FT-IR, Delta; MilkoScan FT 6000, M-Sc). Měření log AC a log BHB za použití M-Sc ukázalo korelaci 0,89 ($P < 0,001$). Umělý přírůstek acetonu do mléka nevykázal za použití MIR-FT (Delta) žádnou výtěžnost. Referenční sada AC musí mít přijatelné statistické parametry jako variační obor hodnot pro dobrou kalibraci MIR-FT (M-Sc). V tomto případě to bylo $10,1 \pm 9,74$ při geometrickém průměru $7,26 \text{ mg.l}^{-1}$, variační obor od

1,98 do 33,66 mg.l⁻¹. Korelace AC mezi Re a MIR-FT (Delta) byla nízká 0,32 (P>0,05). Vztah log AC mezi Re a MIR-FT (M-Sc) byl výrazně lepší 0,80 (P<0,01). Metodický vztah pro log AC pomocí Re a log BHB pomocí M-Sc 0,58 (P<0,05) byl rovněž zajímavý. Přepočet limitu subklinické ketózy > 10 mg.l⁻¹ z vybraných vztahů výsledků AC v mléce pomocí Re na log AC a log BHB pomocí MIR-FT M-Sc by mohl být > -0,80 (zpětná vazba 0,158 mmol.l⁻¹ = 9,25 mg.l⁻¹) a > -1,66. To by mohlo být významné pro problém monitoringu (za použití M-Sc) a interpretace ketózy.

B) Vývoj metod a postupů v nepřímém infračerveném určení acetonu v mléce

Mléčný aceton (AC) je indikátorem energetického metabolismu krav a výskytu ketózy. Interpretace výsledků AC je nezbytná pro prevenci a léčbu stád dojnic. Je zapotřebí účinné metody se spolehlivými výsledky. Cílem bylo vyhodnotit infračervenou metodu ve střední oblasti MIR-FT z hlediska kalibrace pro AC (HANUŠ et al., 2014). Jako referenční (RE) byla použita mikrodifúzní fotometrická metoda (485 nm) se salicylaldehydem a MIR-FT (Lactoscope FT-IR, Delta (D); MilkoScan FT 6000 (F); Bentley (Bentley Instruments (B)) jako nepřímá metoda. Vybrané (od vysoce výkonných dojnic v rané laktaci) individuální vzorky mléka (MS, n = 89) byly použity pro vývoj a vyhodnocení kalibrace MIR-FT. Referenční soubor AC musí mít pro dobrou kalibraci MIR-FT přijatelnou statistiku. Ta byla 7,22 ± 10,69 mg.l⁻¹ a geometrický průměr 5,12 mg.l⁻¹, variace byla v rozmezí od 1,51 do 91,8 mg.l⁻¹. Zaznamenaná korelace AC (r) mezi RE a nepřímou metodou MIR-FT (D) byla nízká (0,22, P<0,05). Stejný ukazatel mezi RE a MIR-FT (F) byl těsnější (0,589, P<0,001). To by mohlo být přijatelné pro praktické použití. Pokud pro F bylo použito nižší n (= 64), byla stejná hodnota 0,632 (P<0,001). To znamená, že 40 % variability výsledků MIR-FT log AC může být vysvětlitelných změnami ve výsledcích RE log AC. Korelace mezi měřením MIR-FT (D a F) log AC byla nižší, 0,315 (P<0,01). Korelace mezi hodnotami log AC a log BHB byly 0,459, 0,843 (P<0,001) a 0,342 (P<0,01). 21,1 a 71,1% variability v hodnotách log BHB (F) MIR-FT může být způsobeno variabilitou výsledků RE log AC a MIR-FT (F) log AC. Umělý přírůstek AC do vzorků mléka neměl viditelný účinek na výtěžnost AC pomocí přístrojů MIR-FT. Hodnoty AC vzrostly z 4,91 a 5,23 na 45,22 mg.l⁻¹ pomocí RE. Neexistuje možnost připravovat referenční vzorky mléka pomocí umělého přírůstku AC pro kalibraci MIR-FT. Výsledky testu skladovatelnosti vzorku mléka byly podobné trendům, pokud jde o přírůstek AC, neboť nebyla potvrzena výtěžnost pomocí MIR-FT. Naopak, příslušný výsledek AC se zvýšil z 5,9 na 29,91 a z 8,23 na 35,44 mg.l⁻¹ prostřednictvím RE. V závislosti na možném odpařování AC (riziko skutečného snížení hodnoty AC při měření) během podmínek uložení je znalost o stabilitě AC v mléčném vzorku významná pro věrohodnost výsledků. Pro metody RE a MIR-FT byly podobné výsledky AC získány po odběru mléka a po 48 hodinách skladování za studena. V uvedených podmínkách nebylo zaznamenáno žádné odpařování AC. Toto jsou nové informace pro analytickou práci a přepravu vzorků při kontrole mléčné užitkovosti. Kalibrace AC na MIR-FT musí být založena na vybraných referenčních vzorcích nativního mléka s vhodným rozsahem kolísání AC a nikoliv na umělých přírůstcích AC do referenčních vzorků, protože v tomto případě není dosaženo výtěžnosti AC pomocí MIR-FT.

C) Predikční hodnota a korelace dvou mléčných ukazatelů v monitoringu energetického metabolismu dvou plemen dojnic

Ketóza je porucha energetického metabolismu dojnic, zhoršuje mléčnou užitkovost, kvalitu mléka a reprodukci a může mít fatální dopad na zvíře. Aceton v mléce (AC) v kombinaci s poměrem tuk/hrubé bílkoviny (F/CP) může být dobrým ukazatelem ketózy. Prevence onemocnění je v praxi velmi významná. Cílem bylo analyzovat vztahy mezi mléčným

ukazatelem energetického metabolismu jako aceton (AC) a složkovým energetickým koeficientem F/CP, které mohou posloužit v kontrole zdraví zvířat a odhadnout jejich prahové indikační hodnoty (HANUŠ et al., 2011 c). Bylo analyzováno 960 individuálních vzorků mléka (MSs) od plemen (1 : 1) dojnic Holštýn (H) a České strakaté (C) z jejich celé laktace a letní a zimní sezóny za tři roky. Mléčná užitkovost sedmi zahrnutých stád kolísala od 5 500 do 10 000 kg. Hodnoty AC byly logaritmicky transformovány. Pomocí statistických parametrů a regresní analýzy byly hodnoceny vlivy chovatelských faktorů na AC a F/CP. Hladiny AC se mezi plemeny H a C lišily nevýznamně ($P > 0,05$) v celé laktaci (1,87 a 1,70 mg.l^{-1} jako geometrické průměry) ale lišily se významně ($P < 0,05$) v první třetině laktace (FTL; $2,20 > 1,72 \text{ mg.l}^{-1}$). Poměr F/CP se mezi plemeny nelišil. Významné rozdíly nebyly konstatovány pro oba ukazatele mezi zimní a letní sezónou. AC a F/CP jsou dobré ukazatele pro monitoring a prevenci subklinické ketózy u dojnic pro jejich dobrý korelační vztah (0,23, 0,28 H, 0,19 C; $P < 0,001$), zejména v FTL (0,33 ($n = 329$), 0,36 H, 0,30 C; $P < 0,001$). Ukazatele korelovaly více v letní než zimní sezóně ($0,38 > 0,29$, $P < 0,001$, v FTL). Nejtěsnější vztah byl nalezen u krav H v FTL v létě (0,48, $P < 0,001$). Diskriminační limity pro subklinickou ketózu, které byly odvozeny od F/CP modelově podle relevantního prahu AC (10 mg.l^{-1}) pomocí vhodných rovnic, by mohly být pro první a další laktace 1,32 a 1,42 (H) a 1,27 a 1,52 (C). Výsledky mohou být použity pro podporu dobré kvality mléka a odpovídající zdravotní stav krav, jejich reprodukci a dlouhověkost v praktickém poradenském servisu.

D) Analýza vztahů mezi některými mléčnými ukazateli energetického metabolismu krav a jejich ketózního stavu

Dobré zdraví je důležité pro reprodukci zvířat a podporu kvality a bezpečnosti potravinového řetězce. Mléko je vhodné pro neinvazivní sledování. Analýzy složení mléka a interpretace výsledků podle podmínek prostředí a fyziologických principů hrají důležitou roli při kontrole zdraví. Ketóza je porucha energetického metabolismu dojnic, zhoršuje doživost (MY), kvalitu mléka a reprodukci zvířat a může mít fatální dopad. Cílem bylo analyzovat vztahy mezi mléčnými ukazateli energetického metabolismu jako aceton (AC) a složkovými koeficienty, které mohou sloužit v kontrole zdraví a odhadnout jejich prahové indikační hodnoty (HANUŠ et al., 2017). AC a poměry tuk/laktóza (F/L) a tuk/hrubé bílkoviny (F/CP) by mohly představovat dobré indikátory ketózy. Bylo použito 960 individuálních vzorků mléka od dojnic plemene Holštýn (H) a České strakaté (CF), 1 : 1. Byla analyzována celá jejich laktace, první třetina laktace (FTL) a letní i zimní sezóna. MY zahrnutých stád (7) kolísala od 5 500 do 10 000 kg za laktaci. Úroveň AC v mléce se nelišily ($P > 0,05$) mezi H a CF v celé laktaci, ale lišily se v FTL (H 3,88 a CF 2,72 mg.l^{-1} , $P < 0,05$). Tento rozdíl 1,16 mg.l^{-1} se rovná 29,9 % a není příliš podstatný. Poměr F/L nebyl ovlivněn ($P > 0,05$) pořadím laktace a sezónou během celé laktace, ale byl tak ovlivněn ($P < 0,01$ a $< 0,05$) v FTL. Jako maximum lze vysvětlit pouze 17,8 % variability (index korelace 0,42, $P < 0,001$) v log AC variabilitou hodnot koeficientu F/L pro CF a FTL v letní sezóně. Dále jako maximum lze vysvětlit až 84,4 % variací (index korelace 0,92; $P < 0,001$) v hodnotách F/CP variacemi F/L pro H v FTL v letním období. Rovnice byly použity pro modelový výpočet AC a F/L indikačních limitů subklinické ketózy pro období FTL. Ty byly od 2,05 do 3,29 mg.l^{-1} u AC a od 0,84 do 0,87 u F/L podle plemen (CF a H) a pořadí laktace (1. a další). Výsledky lze použít v metodách identifikace zdravotních problémů krav, prevence, léčby a řešení problémů během laktace.

E) Popis aplikačního protokolu Ketosis Report

Protokol Ketosis (Ketosis, farm and individual cow report) je výsledkem modelu pro pravděpodobnostní detekci ketóz a zahrnuje všechny výstupy navrženého modelu, umožňuje

automatizované zpracování dat z FTIR analyzátoru za podmínky identifikace dojníc a skládá se z následujících částí (příloha č. 3):

1. Identifikační údaje farmy a údaje o časovém období, které je v aktuálním protokolu vyhodnoceno;
2. Souhrnné tabelované údaje pro jednotlivé skupiny ukazatelů ve sledovaném časovém období. Datový soubor pro souhrnnou tabelaci je pro každý časový úsek (měsíc) rozdělen do dvou částí podle aktuálního laktačního dne jednotlivých dojníc. Riziková skupina pro výskyt ketóz je zde zvolena jako skupina dojníc pod 100 dnů laktace. S popsány skupinami se pak pracuje i v následujících částech protokolu. Pro sledované ukazatele lze zavést dělení do následujících skupin:
 - parametry identifikace a ukazatel užitkovosti – číslo zvířete, laktační den, mléčná užitkovost;
 - ukazatele kvality mléka, resp. hodnot jeho složek, které jsou běžně sledovány v rámci KU a jejich poměrových ukazatelů – obsah tuku, bílkoviny, laktózy, atd.;
 - ukazatele zjištěné FTIR analýzou ve vztahu ke ketózám – obsah acetonu, BHB, predikce obsahu BHB v krvi z profilu FTIR spektra mléka, atd.
3. Vývoj jednotlivých sledovaných ukazatelů ve sledovaném časovém období graficky znázorněný pro obě laktační skupiny dojníc s uvedením intervalů spolehlivosti ($p=0.05$) pro jednotlivé měsíční hodnoty. Pomocí grafů historického vývoje jednotlivých parametrů, lze dedukovat hypotézy o vývoji situace z hlediska výskytu a příčin ketóz a opatření, přijatých pro jejich řešení, stejně jako o účinnosti těchto opatření (např. změn ve výživě). Vzhledem k zobrazeným intervalům spolehlivosti lze také pouhou grafickou interpretací zjistit statistickou průkaznost rozdílů mezi oběma skupinami dojníc – předpokladem v situaci problematické z hlediska výskytu ketóz je např., že riziková skupina dojníc bude mít průkazně vyšší hodnoty ketolátek v mléce.
4. Graficky znázorněné vztahy ukazatelů složení mléka a mléčné užitkovosti s ukazateli složení mléka, které jsou v přímém vztahu k onemocnění ketózou. Pomocí 2 rozměrných bodových grafů jsou znázorněny jednotlivé ukazatele, resp. jejich vztah pro aktuální měsíc zvolený pro detailní protokol. Na ose x každého grafu z matice jsou vyneseny hodnoty obsahu ketolátek pro každou dojnici ve sledovaném období, na ose y pak hodnoty příslušného poměrového ukazatele složení mléka (např. tuk/protein). Graficky jsou opět odlišeny obě skupiny dojníc vytvořené na základě aktuálního laktačního dne. Pomocí takto vytvořeného maticového grafu lze provést detailní vícerozměrnou interpretaci aktuální situace na farmě z hlediska obsahu ketolátek ve vztahu k mléčné užitkovosti, stupni laktace a poměrových ukazatelů a lze tak formulovat hypotézy, případně opatření, pro řešení aktuální situace výskytu ketóz, případně identifikovat rizikové skupiny dojníc – např. „dojnice s vysokou užitkovostí pod 100 dnů laktace v aktuálním měsíci tvoří na maticových grafech izolované skupiny u všech ukazatelů vztahujících se ke ketózám a ve všech poměrových ukazatelích a jsou v silném korelačním vztahu – je nutné se v plánovaných opatřeních zaměřit na rizikovou skupinu dojníc“. Jinou typickou interpretací může být situace, kde na maticových grafech není možno identifikovat izolované skupiny zobrazených

dat – hodnoty pro obě skupiny dojnic mají stejnou distribuci – tuto situaci je možno interpretovat se znalostí provozní situace např. takto: „aktuální měsíc není problém s ketózami (nebo mají ketózu všechny dojnice)“. Vzhledem k zahrnutí ukazatelů složení mléka a užitkovosti je možné na základě podobných interpretací pracovat také na výživových či veterinárních opatřeních pro řešení aktuální situace.

5. Individuální report pro každou dojnici z rizikové laktační skupiny s grafickým zvýrazněním kvantilů v aktuálním měsíčním datovém souboru pro daný podnik/rozsáhlejší databázi a pro všechny sledované parametry ve vztahu k výskytu ketóz. Tento report umožňuje rychlou identifikaci problémových dojnic a analýzu ukazatelů, ve kterých jsou překročeny hodnoty kvantilů pro daný měsíc a analyzovaný soubor dojnic. Pomocí skládání pravděpodobností a modelu je tak možná rychlá a přesná (s přesně stanovenou pravděpodobností) identifikace dojnic s výskytem ketózního onemocnění.

Podle odečtu zprávy Ketosis Report lze pak reagovat v praxi v souladu s výstupy tabulky v příloze č. 4 této metodiky.

4) Závěr certifikované metodiky

Stále významnějším faktorem pro kvalitu mléka, efektivitu chovu, provozní jistotu chovatelů a podporu bezpečnosti potravinového řetězce je dobré zdraví dojnic. Mléko disponuje řadou složek, podle kterých lze metodou neinvazivního monitoringu kontrolovat zdravotní stav krav. Na vyváženost energetického metabolismu mohou poukazovat, při zohlednění plemene, dojivosti a stadia laktace, kombinace mléčných makrosložek – tuku, bílkovin a laktózy, ale i sušiny a sušiny tukuprosté. Významné jsou také složky minoritní, metabolity s úzkou vazbou na výživový stav dojnic, zejména ketony v jejich nejrůznějších formách a močovina, kyselina citronová a vybrané mastné kyseliny mléčného tuku. Mléko zajišťuje snadný odběr vzorků a řada analytických postupů je plně automatizována s vysokou efektivitou a přijatelnými náklady.

Výsledky systému klasické kontroly mléčné užitkovosti v individuálních vzorcích mléka jsou vhodné pro systémové řešení indikace ketózy v praxi chovu dojnic. Výsledky indikace lze využít k výběru praktických opatření léčby nebo prevence ketózy. Certifikovaná metodika poskytuje aplikační protokol Ketosis Report efektivně využitelný pro uvedené účely, který bazíruje na zvýšení efektivity aktuálních informací chovatelů dojnic pro podporu jejich zdravotního stavu, užitkovosti a kvality mléka.

III) Srovnání „novosti postupů“ a předání certifikované metodiky: Systematická souhrnná zpráva energetického zdravotního stavu stáda dojnic – Ketosis Report

- vyvinutá certifikovaná metodika byla předána do užívání chovatelům pro systém kontroly mléčné užitkovosti v elektronické i písemné formě 31. 8. 2017;
- jedná se o nový postup interpretace výsledků kontroly užitkovosti, tedy analytických výsledků majoritních a minoritních složek individuálních vzorků mléka. Výsledky jsou aplikovány k řízení prevence subklinických ketóz a ztrát užitkovosti. Tato skutečnost je doložena příloženými vlastními publikovanými výsledky. Uvedené postupy interpretace jsou

v kontrole užítkovosti České republiky používány nyní krátce a omezeně. Jedná se o uvedení nových postupů, inovaci i uvedení známých skutečností v nových souvislostech.

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

- kontrola existence a aplikace certifikované uplatněné metodiky jako pracovního postupu pro efektivní interpretaci dat z kontroly užítkovosti (KU) v časně laktaci k identifikaci a řízení prevence subklinické ketózy (na mléčných farmách) je proveditelná, prostřednictvím revize dokladů a dokumentů u uživatele metodiky a v navazujících mléčných chovech a prostřednictvím kontroly distribuce související výsledkové dokumentace Ketosis Report;
- certifikovaná uplatněná metodika obsahuje technicko-organizační doporučení, opatření a postupy identifikace výskytu subklinické ketózy dojnic a relevantní interpretace výsledků v prevenci v rámci kontroly mléčné užítkovosti;
- 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 dojnic, prevenční práce s ohledem na rizika v chovu dojeného skotu a poradenství ke kvalitě mléka. Zlepšení prevence ketózy zde může tvořit podíl do 4 % efektu ve smyslu zajištění zlepšeného zdravotního stavu krav, tedy redukce běžných ztrát způsobených produkčními chorobami, které mohou tvořit podle odhadů značné obchodní ztráty. Objem případných ztrát z produkčních poruch za rok v České republice lze vyčíslit na min. 140 000 000 l mléka (z toho 4 % odhadnutého předpokládaného efektu zlepšení činí cca 39 mil. Kč při farmářské ceně 7 Kč za 1 litr mléka).

Náklady na konkrétní zavedení postupu uvedeného v metodice mohou pro uživatele s centrální působností činit podle kvalifikovaného odhadu v ČR celkem 90 tis. Kč (mzdy a poplatky za služby, popř. relevantní hardware, za doplňky softwarového vybavení KU) jednorázově. Činnost se periodicky aktualizuje (měsíčně). Přínos pro uživatele v podobě dodatečných tržeb, za rozšíření spektra a počtu analýz v KU, za provedení rutinní screening-poradenství, podle smluv, by mohl činit, podle kvalifikovaného odhadu, cca 350 tis. Kč ročně. Efekt je opakovatelný po rocích a celkový možný přínos za redukcí ztrát na dojivosti a léčbě, v nadprůměrných mlékařských chovech v ČR, je odhadnut již výše na cca 39 mil. Kč ročně.

VI) Seznam použité související literatury

5) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky

- AGABRIEL, C.- COULON, J. B.- MARTHY, G.- CHENEAU, N.: Facteurs de variation du taux protéique du lait de vache. INRA Product. Anim., 3, 2, 1990, 137-150.
- AGABRIEL, C.- COULON, J. B.- MARTHY, G.: Facteurs de variations du rapport des teneurs en matières grasses et protéiques du lait de vache. INRA Product. Anim., 4, 2, 1991, 141-149.
- 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.
- BERAN, J.- STÁDNÍK, L.- DUCHÁČEK, J.- OKROUHLÁ, M.: Relationships between changes in Holstein cow's body conditions, acetone and urea content in milk and cervical mucus and sperm survival. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., LX, 5, 2012, 39-48.
- BÍRO, D.- LABUDA, J.- CABADAJOVÁ, M.: Factors influencing cow milk production and fat to protein content ratio. (In Slovak) Živoč. Vým. / Czech J. Anim. Sci., 37, 6-7, 1992, 521-528.
- BRANDT, A.- PABST, R.- SCHULTE-COERNE, H.- GRAVERT, H.O.: Die Heritabilität der Futteraufnahme bei Milchkühen. Züchtungskunde, 57, 1985, 299-308.
- BROUTIN, P.: Ketosis detection in DHIA testing - A new global metabolic infrared spectral approach. In: "One Step Ahead" International Seminar, Bentley Instruments, Aarhus, November 7-10, 2016.
- 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.
- COSKUN, B.- INAL, F.- GÜRBÜZ, E.- POLAT, E. S.- ALATAS, M. S.: The effects of additional glycerol in different feed form on dairy cows. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 18, 1, 2012, 115-120.
- DIEKMANN, L.: Energiebilanz vor und nach dem Kalben. Tierzüchter, 2, 1987, 72-73.
- DRIFT VAN DER, S. G. K.- JORRITSMA, R.- SCHONEWILLE, J. T.- KNIJN, H. M.- STEGEMAN, J. A.: Routine detection of hyperketonemia in dairy cows using Fourier transform infrared spectroscopy analysis of β -hydroxybutyrate and acetone in milk in combination with test-day information. J. Dairy Sci., 95, 9, 2012, 4886-4898.
- DUFFIELD, T.: Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., 16, 2000, 231-253.
- DUFFIELD, T. F.- KELTON, D. F.- LESLIE, K. E.- LISSEMORE, K. D.- LUMSDEN, J. H.: Use of test day milk fat and milk protein to detect subclinical ketosis in dairy cattle in Ontario. Can. Vet. J., 38, 1997, 713-718.
- DUFFIELD, T. F.- LISSEMORE, K. D.- MC BRIDE, B. W.- LESLIE, K. E.: Impact of

- hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.*, 92, 2009, 571-580.
- DUCHÁČEK, J.- VACEK, M.- STÁDNÍK, L.- BERAN, J.- VODKOVÁ, Z.- ROHLÍKOVÁ, V.- NEJDLOVÁ, M.: Relationship between energy status and fertility in Czech Fleckvieh cows. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LX, 6, ISSN 1211-8516, 2012, 67-74.
- 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. *Societa 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.
- FÜRL, 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.
- GEISHAUSER, T.- ZIEBELL, K. L.: Fett/Eiweiss-Quotient in der Milch von Rinderherden mit Vorkommen von Labmagenverlagerungen. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 102, 1995, 469-471.
- 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 concentration as an indicator of hyperketonaemia in dairy cows: the critical value revised. *Anim. Sci.*, 63, 1996, 183-188.
- HAMANN, J.- FEHLINGS, K.: Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Herdenproblem. *DVG, Kiel*, 1994.
- HANA, S. S.- AYIED, A. Y.- ABDULLRADA, A. J.: Effect of some environmental factors on milk acetone level and their relationship with milk yield and some contents. *Basrah J. Agric. Sci.*, 20, 2, 2007, 65-75.
- 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.- LUINGE, 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 a, 575-582.
- HEUER, C.- VAN STRAALLEN, W. M.- SCHUKKEN, Y. H.: Prediction of energy balance in high yielding dairy cows with test-day information. *J. Dairy Sci.*, 84, 2001, 471-481.
- HEUER, C.- VAN STRAALLEN, W. M.- SCHUKKEN, Y. H.- DIRKZWAGER, A.- NOORDHUIZEN, J. P. T. M.: Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision. *Liv. Prod. Sci.*, 65, 2000 b, 91-105.
- JAGOŠ, P.- ILLEK, J.- SUCHÝ, P.: Beziehungen zwischen Störungen im Energiestoffwechsel und der Milchezusammensetzung. *Mh. Vet.–Med.*, 46, 1991, 698-699.
- 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.
- HLÁSNÝ, 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.
- JANUŠ, E.- BORKOWSKA, D.: Occurrence of ketone bodies in the urine of cows during the first three months after calving and their association with milk yields. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, 56, 2013, accepted, provisional pdf.
- 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 bydła. *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.
- MANZENREITER, H.- FÜRST-WALTL, B.- EGGER-DANNER, C.- ZOLLITSCH, W.: Zur Eignung des Gehalts an Milchinhaltsstoffen als Ketoseindikator. 40. Viehwirtschaft. Fachtag., 2013, 9-19.
- 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.
- REIST, M.- VON EUW, D.- TSCHUEMPERLIN, K.- LEUENBERGER, L.- CHILLIARD, Y.- HAMMON, H. M.- MOREL, C.- PHILIPONA, C.- ZBINDEN, Y.- KUENZI, N.- BLUM, J. W.: Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 85, 2002, 3314-3327.
- 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. *J. Dairy Sci.*, 90, 2007, 1761-1766.
- 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.
- SIEBERT, F.- PALLAUF, J.: Analyse von Ergebnissen der Milchleistungsprüfung in Hessen im Hinblick auf ein Ketoserisiko. *Züchtungskunde*, 82, 2010, 112-122.
- SCHULZ, T.: Ohne formeln und Tabellen die Leistung gesteigert. *Top Agrar* 5, 1997, 20-22.
- STEEN, A.- OSTERAS, O.- GRONSTOL, H.: Evaluation of additional acetone and urea analyses, and of the fat-lactose-quotient in cow milk samples in the herd recording system in Norway. *J. Vet. Med.*, A 43, 1996, 181-191.
- 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.
- TEDESCO, D.- TAVA, A.- GALLETTI, S.- TAMENI, M.- VARISCO, G.- COSTA, A.- STEIDLER, S.: Effects of sylimarin a natural hepatoprotector, in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 87, 2004, 2239-2247.
- 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,

VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

6) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci certifikované metodiky

Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech:

- 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.- 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, 635-644.
- 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.- FALTA, D.- KLIMEŠOVÁ, M.- SAMKOVÁ, E.- ŘÍHA, J.- CHLÁDEK, G.- ROUBAL, P.- SEYDLOVÁ, R.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Analyse of relationships between some milk indicators of cow energy metabolism and ketosis state. Analýza vztahů mezi některými mléčnými ukazateli energetického metabolismu krav a jejich ketózního stavu. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 65, 4, ISSN 1211-8516, 2017, 1135-1147.
- 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.- 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.- TRAJLÍNEK, J.: Ketózy, vážný problém vysoce dojných stád. Náš chov, 2002, 3, 27-29.
- HANUŠ, O.- HLÁSNÝ, J.- TRAJLÍNEK, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Výsledky vyšetření dojníc 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.- 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.- ŘÍHA, J.- VYLETĚLOVÁ KLIMEŠOVÁ, M.- SAMKOVÁ, E.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Development in indirect infra-red determination of milk acetone. Vývoj v nepřímém infračerveném určení acetonu v mléce. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 62, 5, ISSN 1211-8516, 2014, 919-927.
- HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- SAMKOVÁ, E.- FALTA, D.- CHLÁDEK, G.- VYLETĚLOVÁ - KLIMEŠOVÁ, M.: Cross validation of cut-off limit estimations for milk indicators of subclinical ketosis. Křížová validace odhadů prahových hodnot pro mléčné ukazatele subklinické ketózy. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., LXI, 6, ISSN 1211-8516, 2013 a, 1661-1667.
- 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.- 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.- VYLETĚLOVÁ - KLIMEŠOVÁ, M.- CHLÁDEK, G.- ROUBAL, P.- SEYDLOVÁ, R.: Metaanalysis of ketosis milk indicators in terms of their threshold estimation. Metaanalýza mléčných ukazatelů ketózy ve smyslu odhadu jejich prahových hodnot. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., LXI, 6, ISSN 1211-8516, 2013 b, 1681-1692.
- 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.: Ketosis detection - A new probabilistic approach. In: "One Step Ahead" International Seminar, Bentley Instruments, Aarhus, November 7-10, 2016.
- 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.

Předchozí tématicky relevantní certifikované metodiky k problematice alternativního provedení kontroly mléčné užitkovosti:

HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- HULOVÁ, I.- VYLETĚLOVÁ, M.- KOPECKÝ, J.- GENČUROVÁ, V.- SOJKOVÁ, K.: Certifikovaná metodika MSM 2678846201 CM 6: Referenční materiál pro adjustaci určení kyseliny citrónové pomocí MIR-FT infraanalýzy mléka. Datum certifikace 30. 9. 2009.

HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- KOPECKÝ, J.- SOJKOVÁ, K.: Certifikovaná metodika MSM 2678846201 CM 7: Metodika validace a odhadu nejistoty výsledků měření u minoritních složek a vlastností mléka pro nepřímé metody MIR a MIR-FT v laboratořích kontroly užitkovosti a kvality mléka. Datum certifikace 30. 9. 2009.

KUČERA, J.- ZHANG, Y.- HANUŠ, O.- YONG, T.- HOLÁSEK, R.- ZHANG, X.- BJELKA, M.- WANG, Y.- DUFEK, A.: Certifikovaná metodika MSM 2678846201 CM 16: Rámcové doporučené postupy pro rozvoj chovu skotu s kombinovanou užitkovostí. Datum certifikace 30. 11. 2010.

HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- VYLETĚLOVÁ, M.- ELICH, O.- JEDELSKÁ, R.- HÖFER, J.: Certifikovaná metodika MSM 2678846201 MSM 2672286101 CM 18: Příprava referenčních vzorků a posouzení kvality kalibrace pro stanovení ketonů jako acetonu metodou infračervené spektroskopie FT v mléčných laboratořích. Datum certifikace 13. 12. 2011.

HANUŠ, O.- FALTA, D.- ROUBAL, P.- CHLÁDEK, G.- VYLETĚLOVÁ - KLIMEŠOVÁ, M.- SEYDLOVÁ, R.: Certifikovaná metodika RO0513 CM 24: Identifikace subklinické ketózy krav v časně laktaci podle výsledků dojitosti a individuálních vzorků mléka v kontrole užitkovosti a interpretace výsledků. Datum certifikace 27. 12. 2013.

Ne všechny práce ze seznamu literatury (5, 6), jejichž studium a poznatky byly využity ve vývoji metodiky, jsou citovány explicitně v textu vlastní metodiky pro praxi. Jsou však pro úplnost uvedeny v seznamu výše.

Většina vlastních prací, použitá při tvorbě této certifikované metodiky, byla předtím již samostatně odborně oponována, jak plyne ze seznamu výše.

Afilace QJ1510339 RO1417 CM 34

Projekty a podpory rozvoje instituce (podíly): NAZV KUS QJ1510339 (60 %) a MZe RO1417 (40 %).

Oponenti CM: Ing. Zdeňka Hegedušová, Ph.D., Taura ET s.r.o., Litomyšl; Ing. Zdenka Majzlíková, Česká plemenářská inspekce.

Autorský kolektiv (podíly): Jan Říha (50 %), Oto Hanuš (25 %), Radoslava Jedelská (5 %), Petr Roubal (5 %), Růžena Seydlová (5 %), Marcela Klimešová (5 %), Jaroslav Kopecký (5 %).

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: 31. 8. 2017



Za zhotovitele:
Mgr. Jan Říha, Ph.D.

.....

Výsledky řešení metodického problému v CM 34 byly formou vyhodnocení zpracovány pro publikace v odborném tisku.

Certifikovaná metodika pro praxi byla podporována řešením projektů MZe NAZV KUS QJ1510339 a MZe RO1417.

7) Přílohové materiály s podklady pro vývojovou práci v rámci certifikované metodiky

Přílohy této certifikované uplatněné metodiky (Systematická souhrnná zpráva energetického zdravotního stavu stáda dojnic – Ketosis Report) tvoří vlastní výsledky vývoje a metodického testování, tzn. tabulkové a grafické zpracování statistických dat.

Přílohy

Příloha č. 1, pdf: Ketosis detection in DHI testing by Pierre Broutin NF

Příloha č. 2, pdf: Ketosis detection - a new probabilistic approach by Jan Riha

Příloha č. 3, pdf: Modelový protokol Ketosis Report

Příloha č. 4, pdf: Tabulka praktické reakce na identifikaci ketóz



Steins Laboratorium



“One Step Ahead” International Seminar
Aarhus, November 7-10, 2016





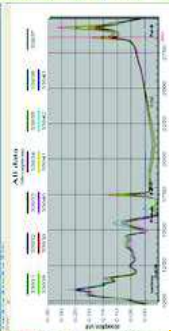
Ketosis detection in DHIA testing

A new global metabolic infrared spectral approach

*Pierre Broutin,
Managing Director/Senior Scientist*



Why testing for ketosis?



In high producing dairy cows during early lactation, a negative energy balance (NEB) can be induced by an imbalance between energy intake and increasing demand for milk production leading to:

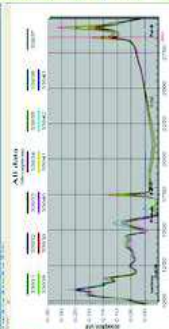
- Fat mobilization from adipose tissue
- Production of ketone bodies (acetone, β -hydroxybutyrate...).
- Sub-clinical(SCK) or clinical ketosis (CK)

Ketosis metabolic disorder has a high prevalence (12-43%), is difficult to detect (1/5), and can lead to major negative impacts on dairy farms profitability and animal welfare:





Why testing for ketosis?



In high producing dairy cows during early lactation, a negative energy balance (NEB) can be induced by an imbalance between energy intake and increasing demand for milk production leading to:

- Fat mobilization from adipose tissue
- Production of ketone bodies (acetone, β -hydroxybutyrate...).
- Sub-clinical(SCK) or clinical ketosis (CK)



Ketosis metabolic disorder has a high prevalence (12-43%), is difficult to detect (1/5), and can lead to major negative impacts on dairy farms profitability and animal welfare:

- Decrease in milk production (-300 to 450 kg/lactation) (Duffield,2000)
- Substantial modification of milk composition (fat \uparrow , protein \downarrow , fatty acids profile...)
- Impaired reproduction with conception rate at AI1 down -3 to 35% (Fourichon et al,2000)
- Increased risk for other metabolic disorder (clinical ketosis, displaced abomasum, metritis...)
- Increased severity and duration of mastitis cases with depletion of the immune system
- Indirectly increases culling rate

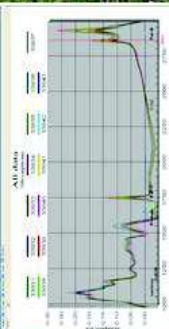


How to diagnose subclinical ketosis (SCK)?

2 types of ketosis and associated biomarkers:

2 types of ketosis and associated biomarkers:			
Ketosis type	biomarker	Concentration range	Status
Hypoglycemic	high [Blood BHB] *	Blood BHB > 1,2 mmol/l	SCK

* BLOOD BHB = GOLD STANDARD
 ** NEFA: Non Esterified Fatty Acids

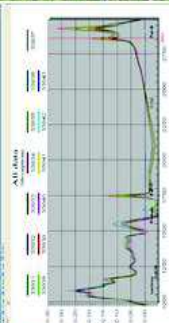


How to diagnose subclinical ketosis (SCK)? 2 types of ketosis and associated biomarkers:

2 types of ketosis and associated biomarkers:			
Ketosis type	biomarker	Concentration range	Status
Hypoglycemic	high [Blood BHB]*	Blood BHB > 1,2 mmol/l	SCK
Hyperglycemic	high [NEFA] in blood**	< 0,4 mmol/l	physiological
		0,4-0,6 mmol/l	mild mobilization
		> 0,6 mmol/l	severe fat mobilization

But Blood BHB (Gold Standard) & NEFA determinations are invasive and not practical for routine DHIA testing

* BLOOD BHB = GOLD STANDARD
** NEFA: Non Esterified Fatty Acids

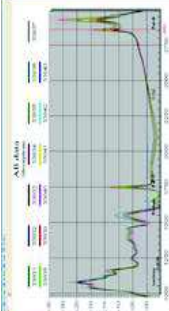




Are Ketosis biomarkers detectable in milk by infrared?




Gold Standard: Blood BHB

- 
- **Milk Acetone:** - very volatile and low concentration in milk **typically < IR detection limit**
 - **Milk BHB:** - more stable than acetone but levels also very low **typically < IR detection limit**
 - content decreases also rapidly if milk not stored at 4°C right after milking



- Milk BHB (0.10 – 0,60 mmol/L) = (1,04–6,24 mg/dl!!) << urea (10-100 mg/dl)

- Correlation (r) between milk and blood BHB very variable (0,00-0,87) (*Enjalbert et al. 2001*)



Cc: Direct Milk Acetone & BHB determination by IR present some major drawbacks because of their volatility, very low concentration levels, and very variable correlation with blood BHB (Gold Standard)

Which biomarker should be monitored by infrared?

ratio in mammary blood for BBHBA concentrations ranging from 200 to 5500 $\mu\text{mol/L}$. On the contrary, Filar (1979) found that the BAcAc/BBHBA ratio increased from about 0.08 in healthy cows (mean BBHBA 430 $\mu\text{mol/L}$) to 0.14 in cows with subclinical ketosis (mean BBHBA 1250 $\mu\text{mol/L}$), and 0.24 in ketotic cows (mean BBHBA 3270 $\mu\text{mol/L}$). A similar trend was found by Andersson (1984).

Cows in negative energy balance oxidize large amounts of fatty acids in the liver cells, which leads to a high NADH/NAD ratio in the mitochondria. However, in the liver of ruminants, conversion of BHBA to AcAc, which needs NAD, does not depend on the mitochondrial NADH/NAD ratio because this conversion is cytosolic (Koundakjian and Snoswell, 1970). In ketotic cows, the cytosolic NADH/NAD ratio is low (Heitmann et al., 1987), so that BHBA is converted to AcAc, which explains that in ketosis-induced cows, the AcAc/BHBA ratio in the liver cells increased (Mills et al., 1986). However, this BAcAc/BBHBA ratio also depends on the body condition of the cows, because after induction of ketosis, obese cows had a lower BAcAc/BBHBA ratio than normal cows

one bodies ranged from 0.68 to 0.75. Much lower values, varying from 0.11 to 0.43, were published by Andersson (1984), but with a similar ratio of milk Ac (MAc) to milk AcAc (MAcAc).

Milk Ac was very close to BAc, with a mean MAc/BAC ratio of 1.04. Similarly, Andersson (1984) observed such a close relationship ($r = 0.96$), but with a mean MAc/BAC ratio of 0.95. The relationship between concentrations in blood and milk was not as strong for AcAc and BHBA. Concentrations in milk were much lower than concentrations in blood, and BAcAc and BBHBA explained only 55 and 43% of the variations of MAcAc and MBHBA, respectively. Andersson (1984) also found a low correlation coefficient between BAcAc and MAcAc ($r = 0.45$) and no relationship between MBHBA and BBHBA ($r = -0.01$). In a recent paper, Geishauser et al. (1998) reported from literature that correlation coefficients between BBHBA and MBHBA range, according to author, from 0.00 to 0.87. Because BHBA can be used by the mammary gland for fatty acids synthesis and AcAc can be converted to butyrate (Dodds et al., 1981), lower concentrations in milk than in blood could be expected. Our

Table 3. Milk BHBA concentrations measured for the 5 different values of Ketolac strip test.

Enjalbert et al.
Journal Dairy Science
2001 84:583-589

Correlation (r) between milk and blood BHB very variable (0,00-0,87)

➔ Milk BHB not a reliable biomarker for SKC



A new global metabolic infrared spectral approach for Blood BHB prediction and SKC detection

1 – Is there a correlation between ketosis metabolic disorder and overall milk composition & spectra?

2 - Can the metabolic disorder be modeled (PLS) to predict Blood BHB from the milk spectra?

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Brevets internationaux

(43) Date de la publication internationale
23 avril 2015 (23.04.2015)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2015/055966 A1

(51) Classification internationale des brevets
G01N 2127 (2006.01) G01N 2131 (2006.01)
G01N 2125 (2014.01) C12Q 1/22 (2006.01)
G01N 2134 (2006.01) G01N 2135 (2006.01)
G01N 2149 (2006.01) G01N 2157 (2014.01)
A61B 5/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale
PCT/FR2014/052450

(22) Date de dépôt internationale
17 octobre 2014 (17.10.2014)

(25) Langue de dépôt
français

(26) Langue de publication
français

(36) Données relatives à la priorité
1304145 18 octobre 2013 (18.10.2013)

(71) Déposant
BENTLEY INSTRUMENTS (FR) 14 rue d'Inchbuck, F-59000 Lille (FR)

(72) Inventeur
BROUTIN, Pierre; 14 rue d'Inchbuck, F-59000 Lille (FR)

(74) Mandataire
LEFFYRE, Marlène; Ravin SAS, 8 rue des Biquettes, BP 10077, ZA de Font Ganne, F-31700 Blagnac Cedex (FR)

(81) Exam désigné (sans indication contraire, pour tout pays de protection nationale désigné) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BS, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GR, GT, HK, HU, IL, IN, JP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MU, MV, MY, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SI, SK, ST, SV, SY, TH, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, ZA, ZM, ZW

(84) Exam désigné (sans indication contraire, pour tout pays de protection régionale désigné) : AEPV (EP), AU, CA, CL, CN, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL, IN, JP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MU, MV, MY, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SI, SK, ST, SV, SY, TH, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, ZA, ZM, ZW

(54) Titre : DETERMINATION OF THE CONCENTRATION OF A COMPONENT IN ONE FLUID OF AN ANIMAL BY SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF ANOTHER FLUID

(54) Titre : DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION D'UN COMPOSANT DANS UN FLUIDE D'UN ANIMAL PAR ANALYSE SPECTROSCOPIQUE D'UN AUTRE FLUIDE

(Figure 10: A scatter plot showing the relationship between reference BHB (mg/dl) on the x-axis and predicted BHB (mg/dl) on the y-axis. The regression equation is y = 0.9986x + 0.2778, with R-squared = 0.9748 and N = 10. The plot shows a strong positive linear correlation between the two variables.)

(Note sur la page suivante)

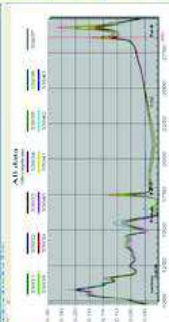
Current:

Ketosis

New:

Blood BHB/Ketosis(gold standard)

Prediction of the Blood BHB from the milk spectra by modeling the milk composition overall variations induced directly or indirectly by the metabolic disorder under consideration



Blood BHB determination by infrared spectroscopy for the monitoring of the cows metabolic activity and SKC detection

Study Protocol:

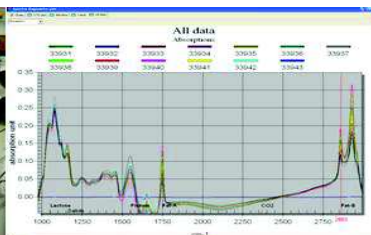
- 696 Holstein cows tested for blood BHB (Optium Xceed reader) over a 6 months period (DIM<100)
- Blood taken from the coccygeal vein (AM/PM)
- Samples cooled down immediately at 4°C after milking
- Milk samples tested on Bentley FTS within 12 hours to collect MIR spectra
- Development of a PLS model to predict Blood BHB based on Milk spectra



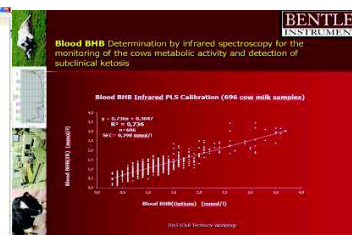
Optium Xceed reader



Bentley Ilas Combi 600



MIR spectra



Blood BHB PLS Calibration

A new global metabolic infrared spectral approach for Blood BHB prediction and SKC detection

Poor correlation between Blood and Milk BHB

n=280 (individual cows)

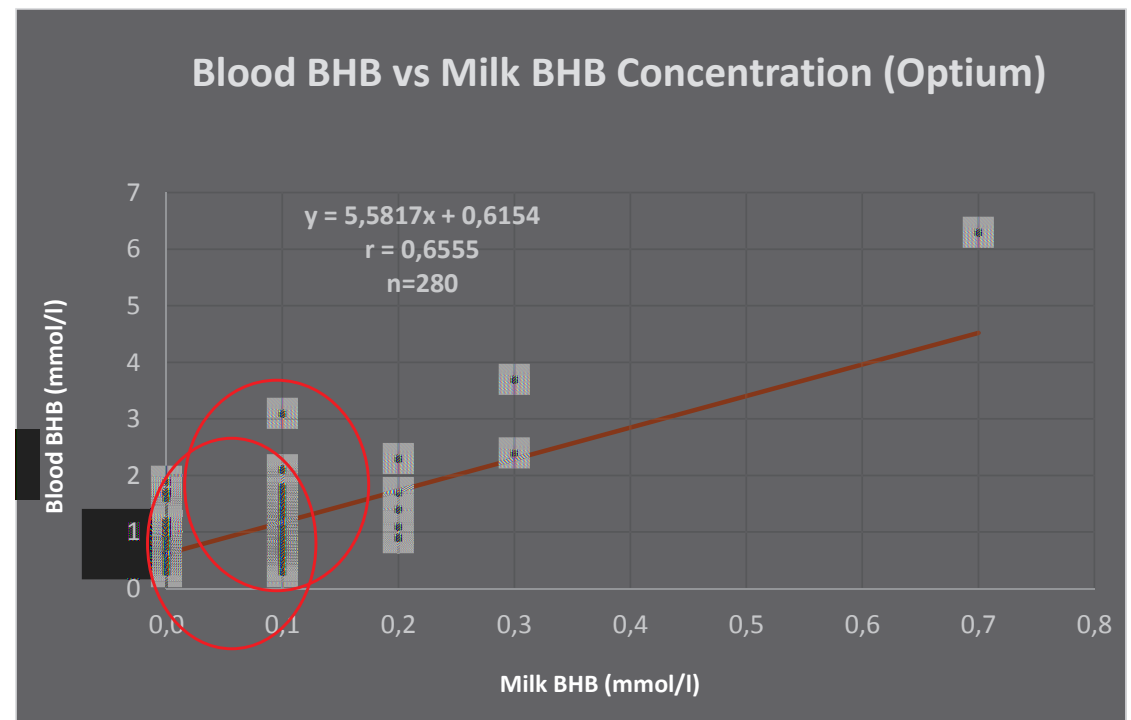
Mean Blood BHB = 1,043 mmol/L = 10,41 mg/dl

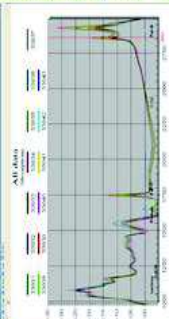
Mean Milk BHB = 0,058 mmol/l = 0,6 mg/dl < DL

Blood BHB > 13,6 x Milk BHB

r=0,6555 (r=0,66* but can vary from 0 to 0,87)

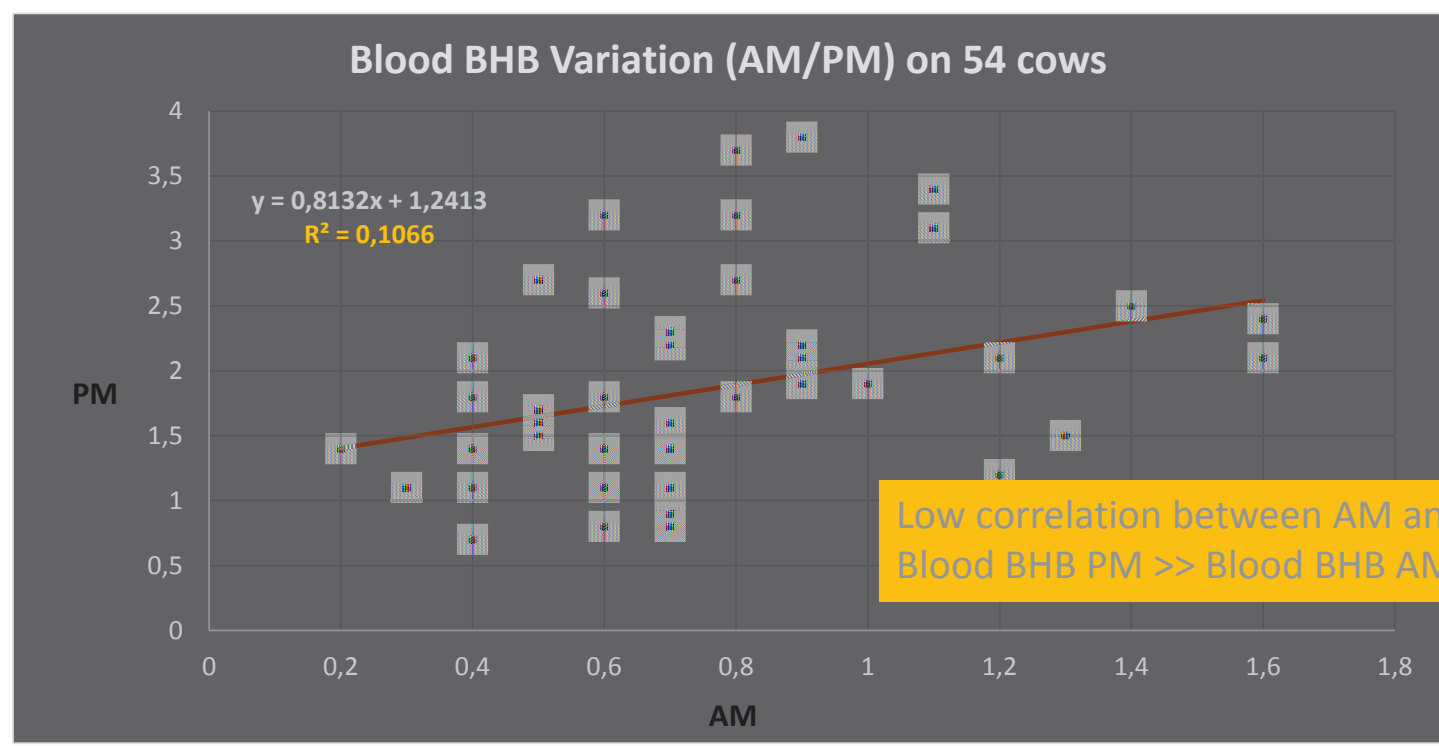
*Enjalbert et al. Journal Dairy Science, 2001 84:583-589

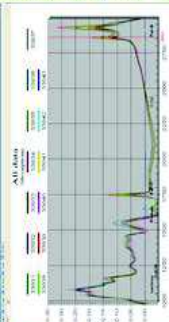




A new global metabolic infrared spectral approach for Blood BHB prediction and SKC detection

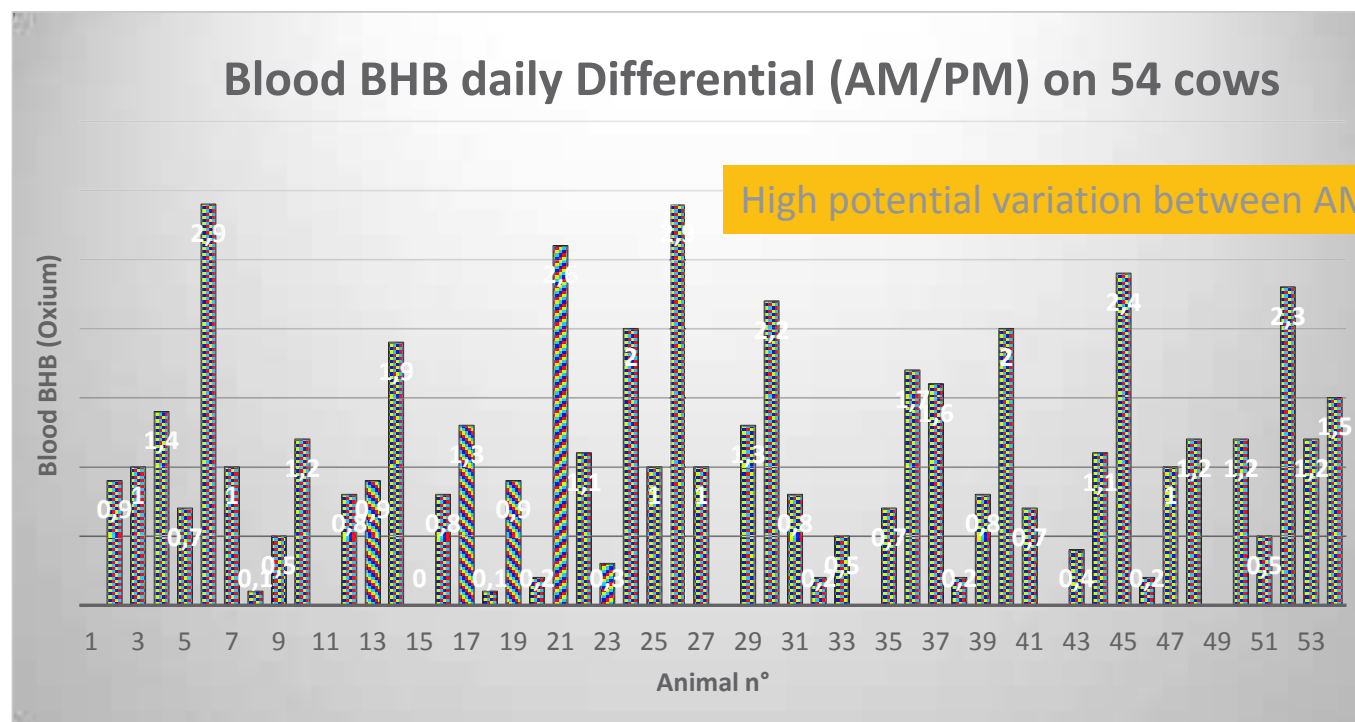
Evaluation of the Blood BHB daily variation (Optium)

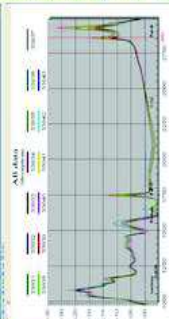




A new global metabolic infrared spectral approach for Blood BHB prediction and SKC detection

Evaluation of the Blood BHB daily variation (Optium)





A new global metabolic infrared spectral approach for Blood BHB prediction and SKC detection

Evaluation of the Blood BHB daily variation (Optium)

Blood BHB Daily Variations: 3 Cases

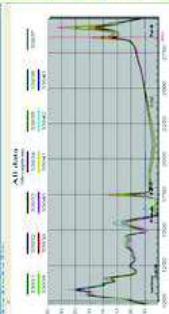
Cow	PM	AM	PM	AM	PM	AM	Mean BHB (mmol/l)
n°1	2,6	2,1	2,1	2,2	3,3	3,0	2,6
n°2	0,9	0,7	0,7	0,6	0,9	0,8	0,8
n°3	2,6	0,7	1,4	0,7	2	0,6	1,3

→ Blood BHB PM >> Blood BHB AM

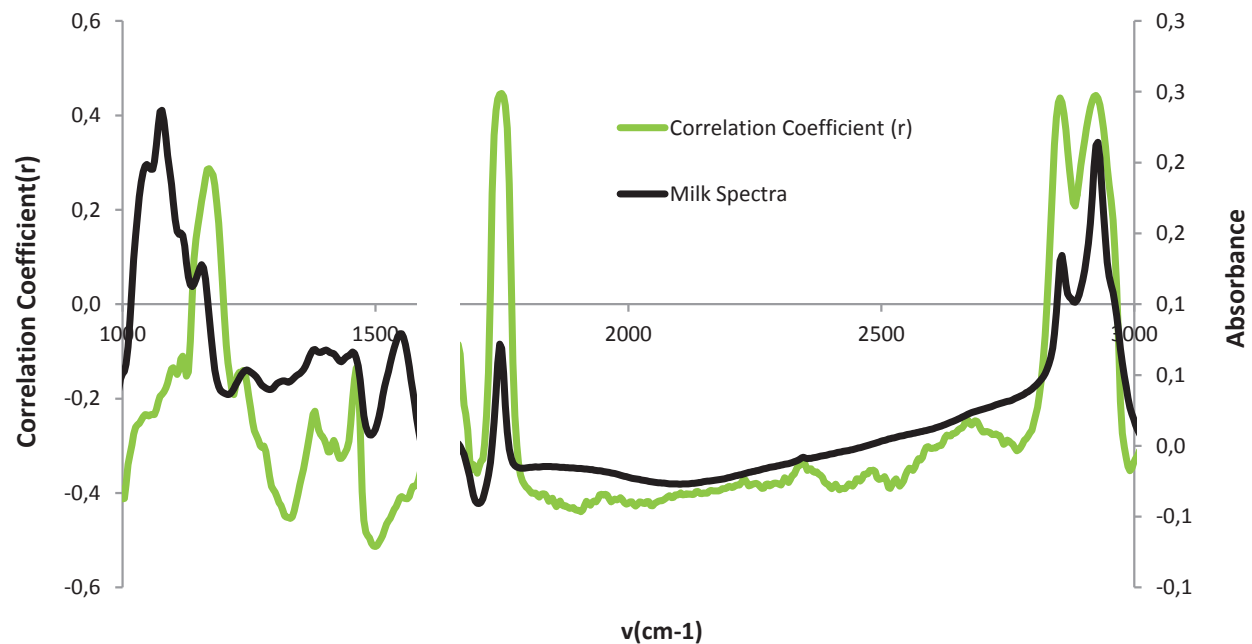
→ Poor correlation ($r^2=0,11$) between Blood BHB AM and PM

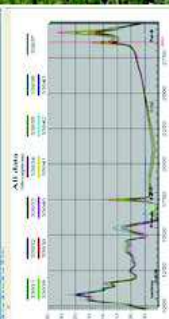


1 – Is there a correlation between SKC metabolic disorder and overall milk composition & spectra (696 samples)?

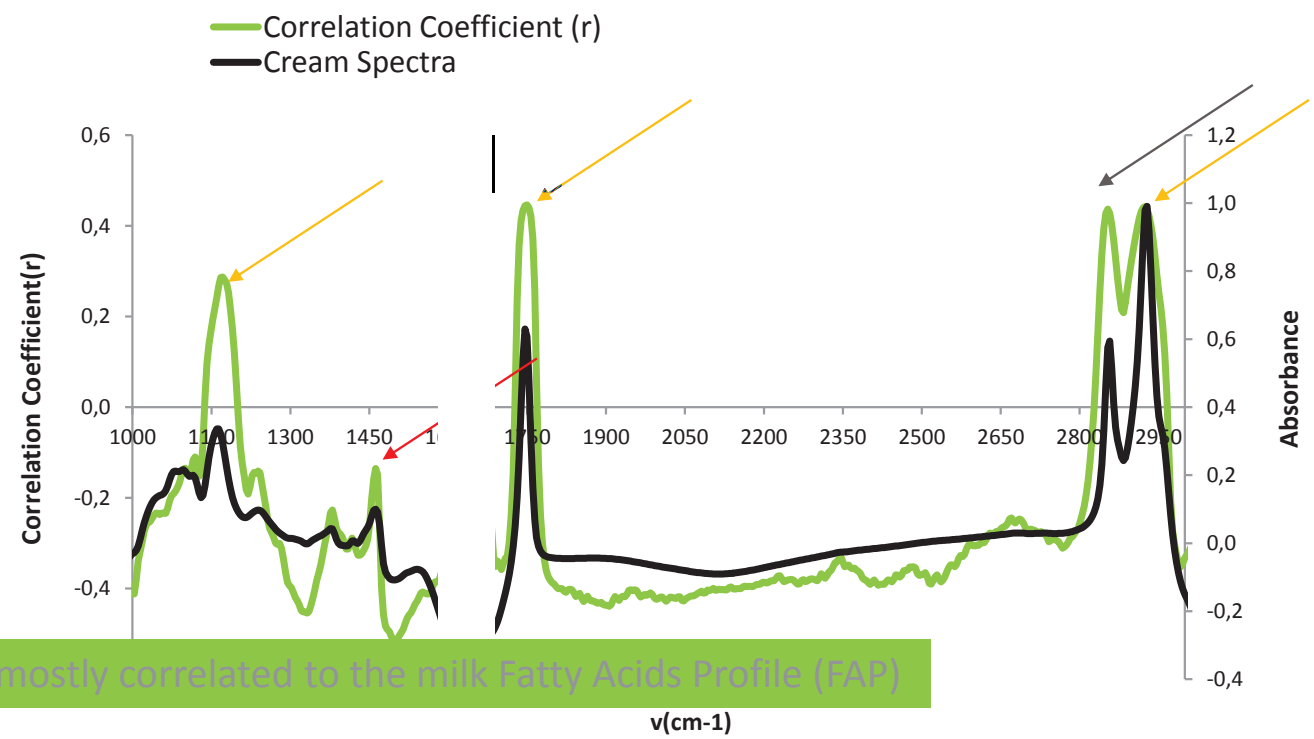


Correlation(r) between Blood BHB and Milk spectra

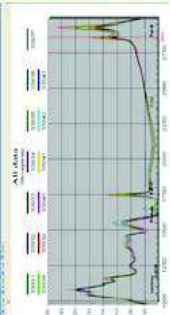




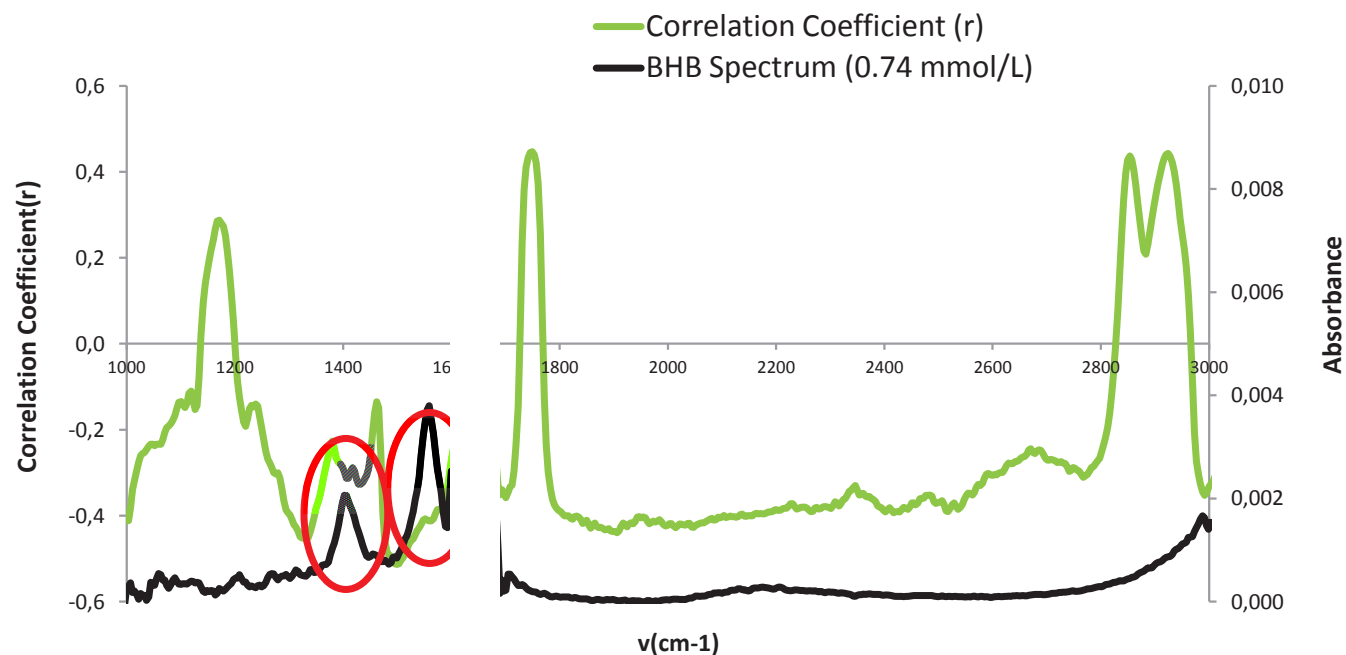
1 – Is there a correlation between SKC metabolic disorder and overall milk composition & spectra (696 samples)?



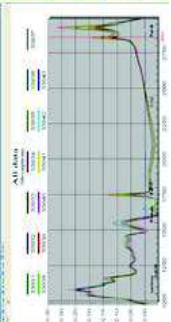
Cc: Blood BHB is mostly correlated to the milk Fatty Acids Profile (FAP)



1 – Is there a correlation between SKC metabolic disorder and overall milk composition & spectra (696 samples)?



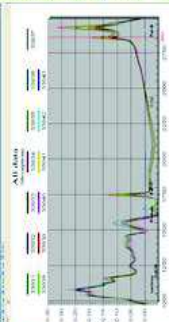
Cc: Low correlation between Milk spectra and Blood BHB where BHB molecule main absorption wavebands are located (1410; 1562 cm^{-1})



1 – Is there a correlation between SKC metabolic disorder and overall milk composition & spectra (696 samples)?

Components (X)	r/BBHB(Optium)	BBHB <1,2 (mmol/l)	BBHB >1,2* (mmol/l)	Wi	% Wi
Protein	-0,26	32,58	31,56↓	-1,02	-3,13%
Palmitic(C16:0)	-0,13	1,36	1,35=	-0,01	-0,81%
SCC	-0,12	165,00	114,00↓	-51,00	-30,91%
Saturated FA	-0,07	2,73	2,76	0,03	1,21%
Lactose	0,02	48,07	48,45↑	0,38	0,79%
Fat	0,15	41,73	43,34↑	1,61	3,86%
Poly Unsaturated FA	0,27	0,16	0,17	0,02	10,97%
Fat/Protein	0,39	1,270	1,379↑	0,100	7,82%
Unsaturated FA	0,47	1,03%	1,35%↑	0,15%	12,50%↑
Mono Unsaturated FA	0,48	1,03%	1,20%↑	0,12%	11,11%↑
Oleic (C18:1)%	0,52	0,84%	0,96%↑	0,13%	15,21%↑
Stearic (C18:0)%	0,57	0,36%	0,41%↑	0,06%	16,01%↑
Oleic/Protein	0,66	0,026	0,031↑	0,005	19,23%↑
Stearic/Protein	0,66	0,011	0,013↑	0,002	18,18%↑

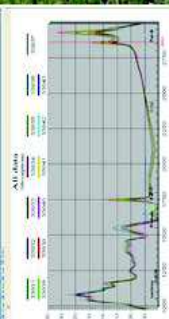
More research under way: 416 fatty acids in bovine milk (Jensen, 2002)



1 – Is there a correlation between SKC metabolic disorder and overall milk composition & spectra (696 samples)?

Components (X)	r/BBHB(Optium)	BBHB <1,2 (mmol/l)	BBHB >1,2* (mmol/l)	Wi	% Wi
Protein	-0,26	32,58	31,56↓	-1,02	-3,13%
Palmitic(C16:0)	-0,13	1,36	1,35=	-0,01	-0,81%
SCC	-0,12	165,00	114,00↓	-51,00	-30,91%
Saturated FA	-0,07	2,73	2,76	0,03	1,21%
Lactose	0,02	48,07	48,45↑	0,38	0,79%
Fat	0,15	41,73	43,34↑	1,61	3,86%
Poly Unsaturated FA	0,27	0,16	0,17	0,02	10,97%
Fat/Protein	0,39	1,279	1,379↑	0,100	7,82%
Unsaturated FA	0,47	1,20%	1,35%↑	0,15%	12,50%↑
Mono Unsaturated FA	0,48	1,08%	1,20%↑	0,12%	11,11%↑
Oleic (C18:1)%	0,52	0,84%	0,96%↑	0,13%	15,21%↑
Stearic (C18:0)%	0,57	0,36%	0,41%↑	0,06%	16,01%↑
Oleic/Protein	0,66	0,026	0,031↑	0,005	19,23%↑
Stearic/Protein	0,66	0,011	0,013↑	0,002	18,18%↑

More research under way: 416 fatty acids in bovine milk (Jensen, 2002)

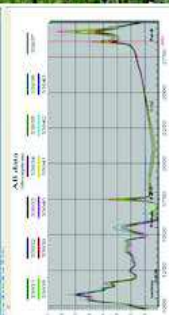


1 – Is there a correlation between SKC metabolic disorder and overall milk composition & spectra (696 samples)?

Components (X)	r/BBHB(Optium)	BBHB <1,2 (mmol/l)	BBHB >1,2* (mmol/l)	Wi	% Wi
Protein	-0,26	32,58	31,56↓	-1,02	-3,13%
Palmitic(C16:0)	-0,13	1,36	1,35=	-0,01	-0,81%
SCC	-0,12	165,00	114,00↓	-51,00	-30,91%
Saturated FA	-0,07	2,73	2,76	0,03	1,21%
Lactose	0,02	48,07	48,45↑	0,38	0,79%
Fat	0,1	41,73	43,34↑	1,61	3,86%
Poly Unsaturated FA	0,27	0,16	0,17	0,02	10,97%
Fat/Protein	0,39	1,279	1,379↑	0,100	7,82%
Unsaturated FA	0,47	1,20%	1,35%↑	0,15%	12,50%↑
Mono Unsaturated FA	0,48	1,08%	1,20%↑	0,12%	11,11%↑
Oleic (C18:1)%	0,52	0,84%	0,96%↑	0,13%	15,21%↑
Stearic (C18:0)%	0,57	0,36%	0,41%↑	0,06%	16,01%↑
Oleic/Protein	0,66	0,026	0,031↑	0,005	19,23%↑
Stearic/Protein	0,66	0,011	0,013↑	0,002	18,18%↑

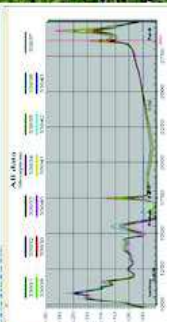
More research under way: 416 fatty acids in bovine milk (Jensen, 2002)

Bentley Fatty Acids Calibrations

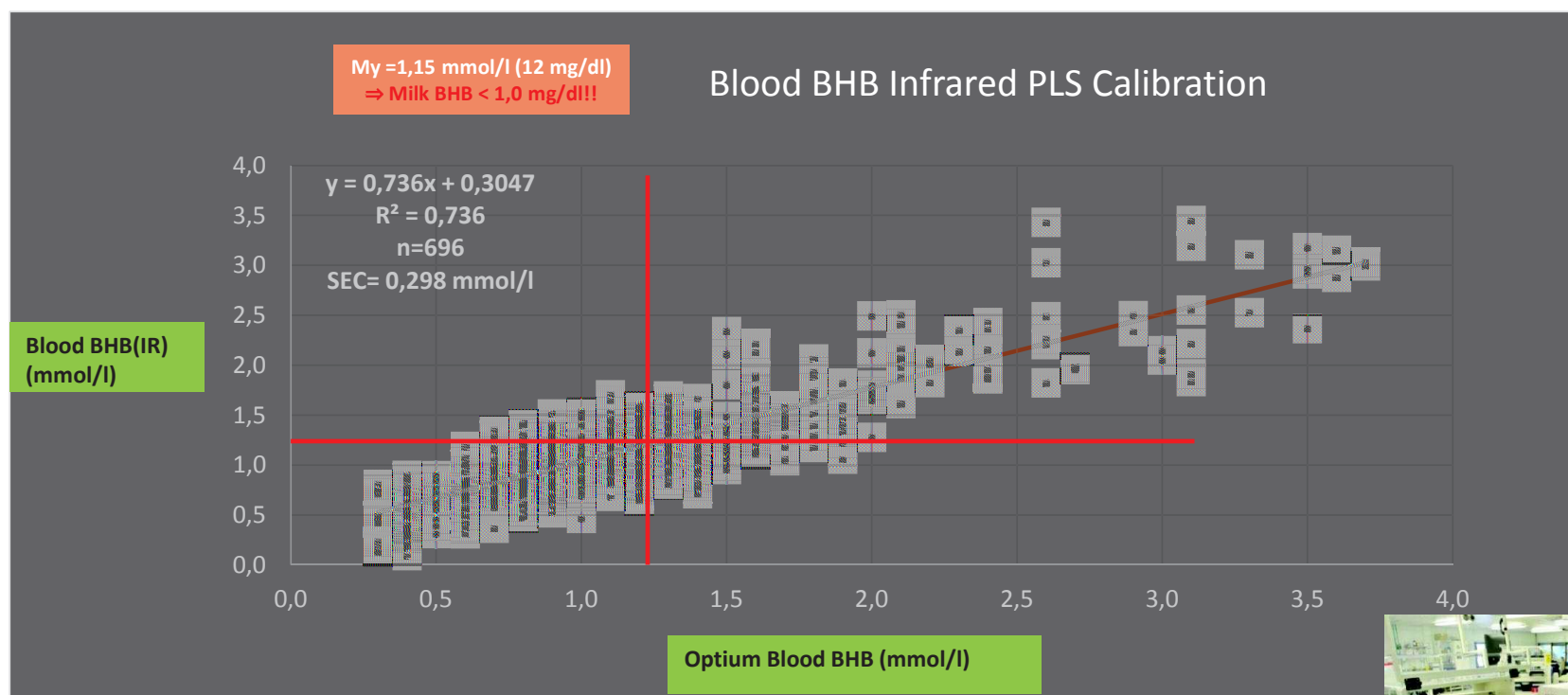


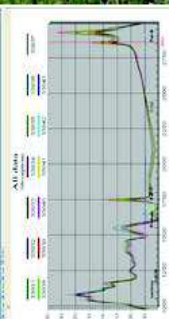
Typical results obtained on bulk cow milk with PLS Calibrations					
Components	Measuring Range	Validation range	Repeatability (Sr)	Accuracy (Sy,x) (Bulk)	Carry-Over
C:16:0 (Palmitic)	0,43-2,45%	0,78-1,51%	0.027%	0.056% (0,070-0,094)*	< 1.0%
C:18:0 (Stearic)	0,12-0,70%	0,24-0,47%	0.012%	0.035% (0,040-0,055)*	< 1.0%
C:18:1 (Oleic)	0,21-1,81%	0,34-1,81%	0.020%	0,027%-0.050%	< 1.0%
Saturated FA	0,96-4,50%	1,27-4,38%	0.025%	0.045% (0,037-0,055)*	< 1.0%
Unsaturated FA	0.41-2.17%	0,41-2,17%	0.024%	0.049%	< 1.0%
Mono Unsaturated FA	0,33-1,99%	0,37-1,96%	0.023%	0.046% (0,040-0,061)*	< 1.0%
Poly Unsaturated FA	0.03-0.24%	0,10-0,24%	0.006%	0.020% (0,010-0,020)*	< 1.0%

* Bulletin of International Dairy Federation 406/2006, p.25

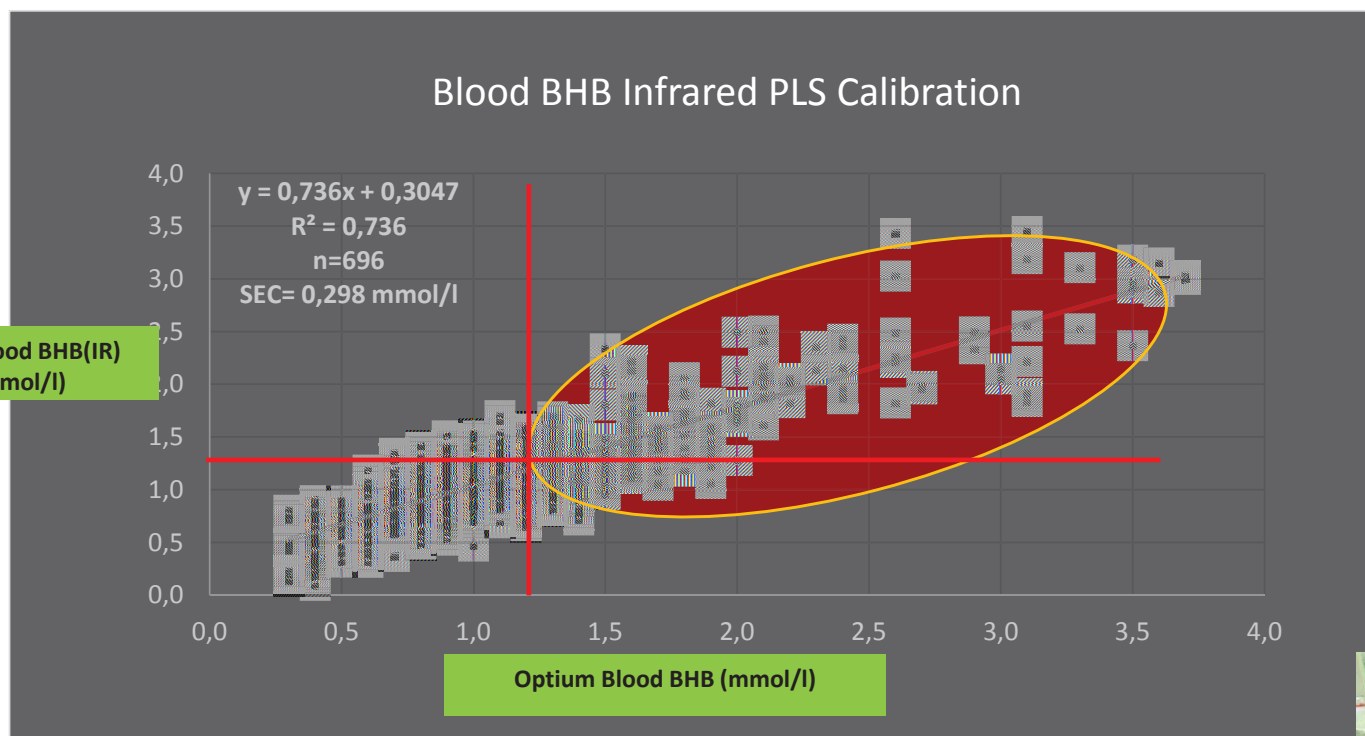


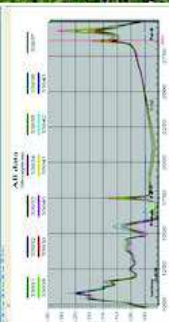
2 - Can the metabolic disorder be modeled (PLS) to predict Blood BHB indirectly? Yes



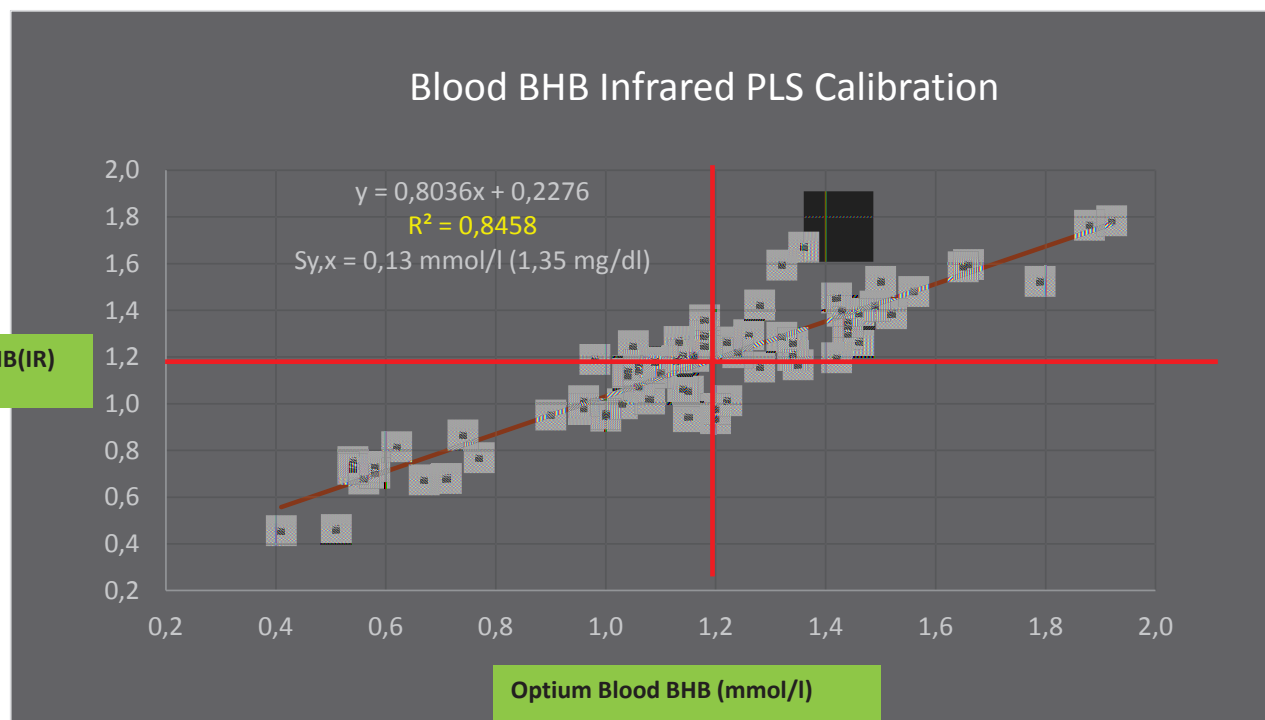


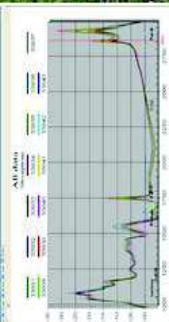
A new global metabolic infrared spectral approach How to implement it?



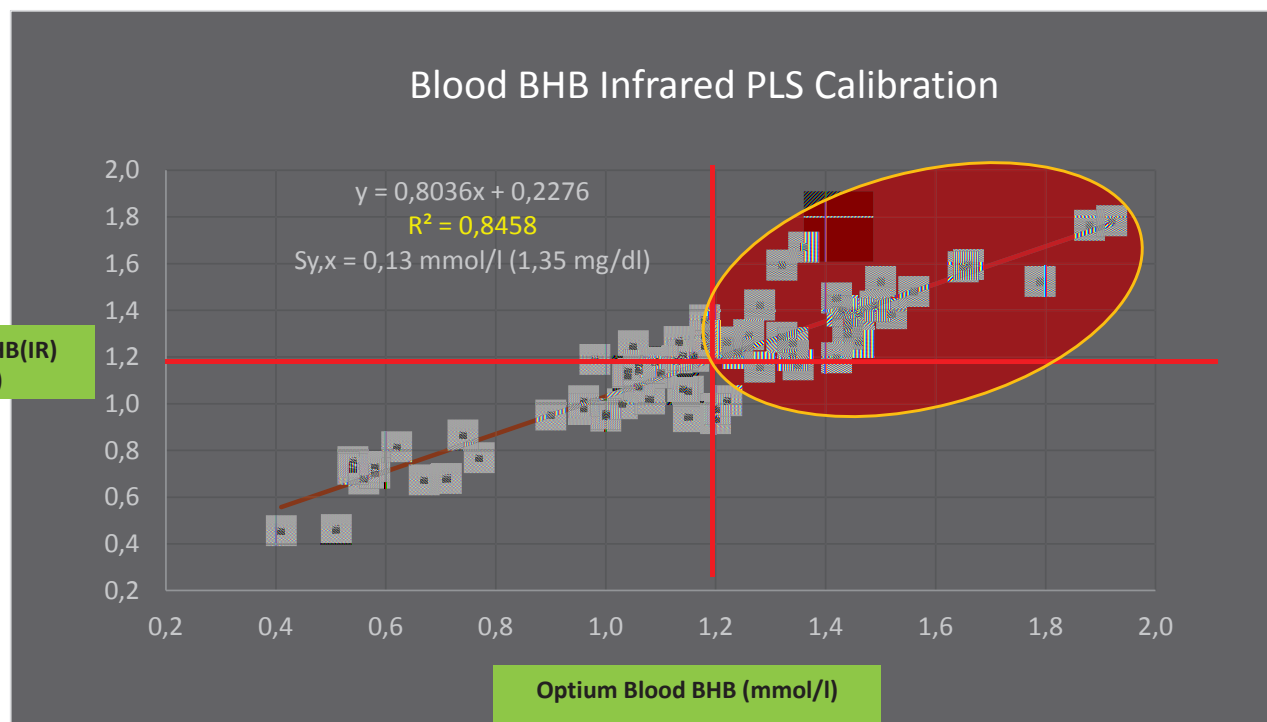


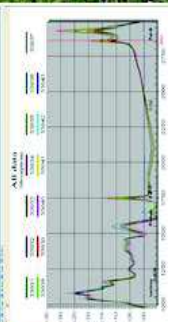
A new global metabolic spectral approach How to implement it?



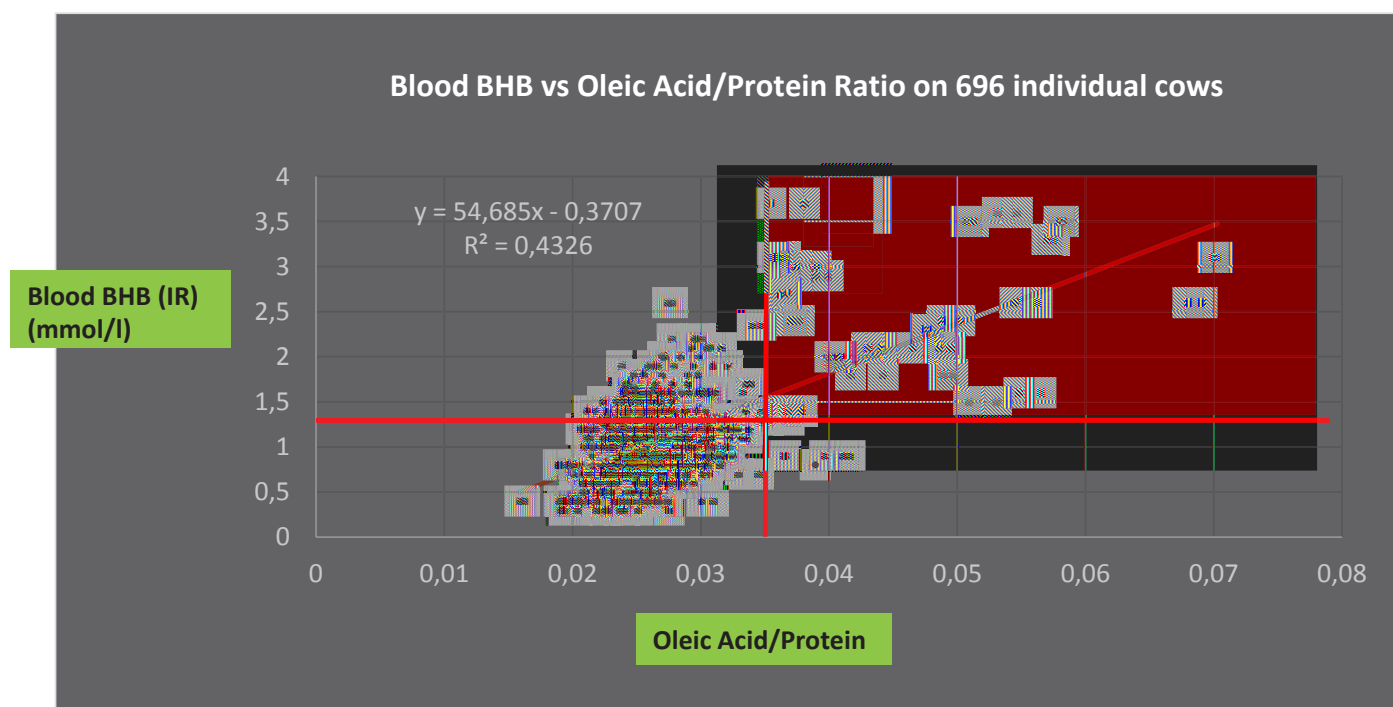


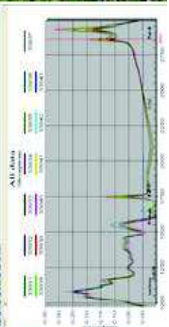
A new global metabolic infrared spectral approach How to implement it (at herd level)?



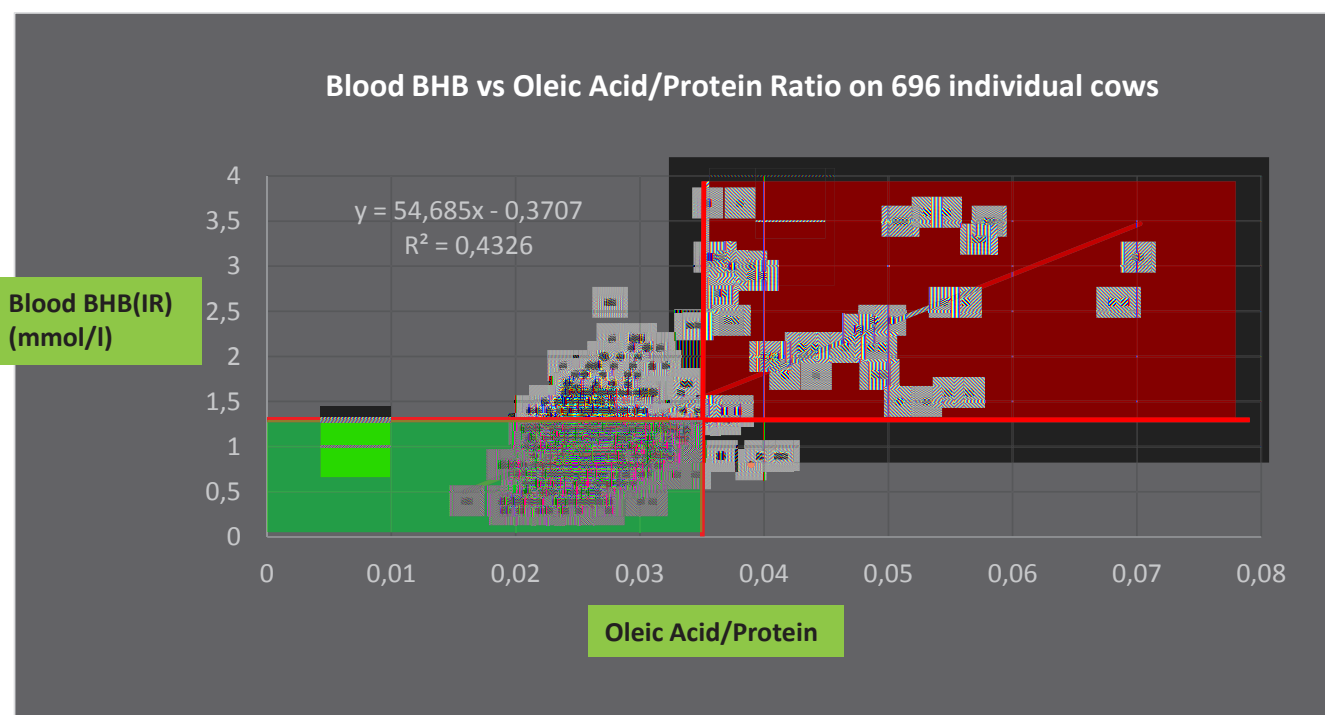


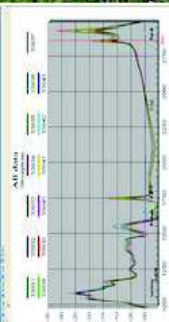
How to improve still ketosis diagnostic? A multi-dimension approach



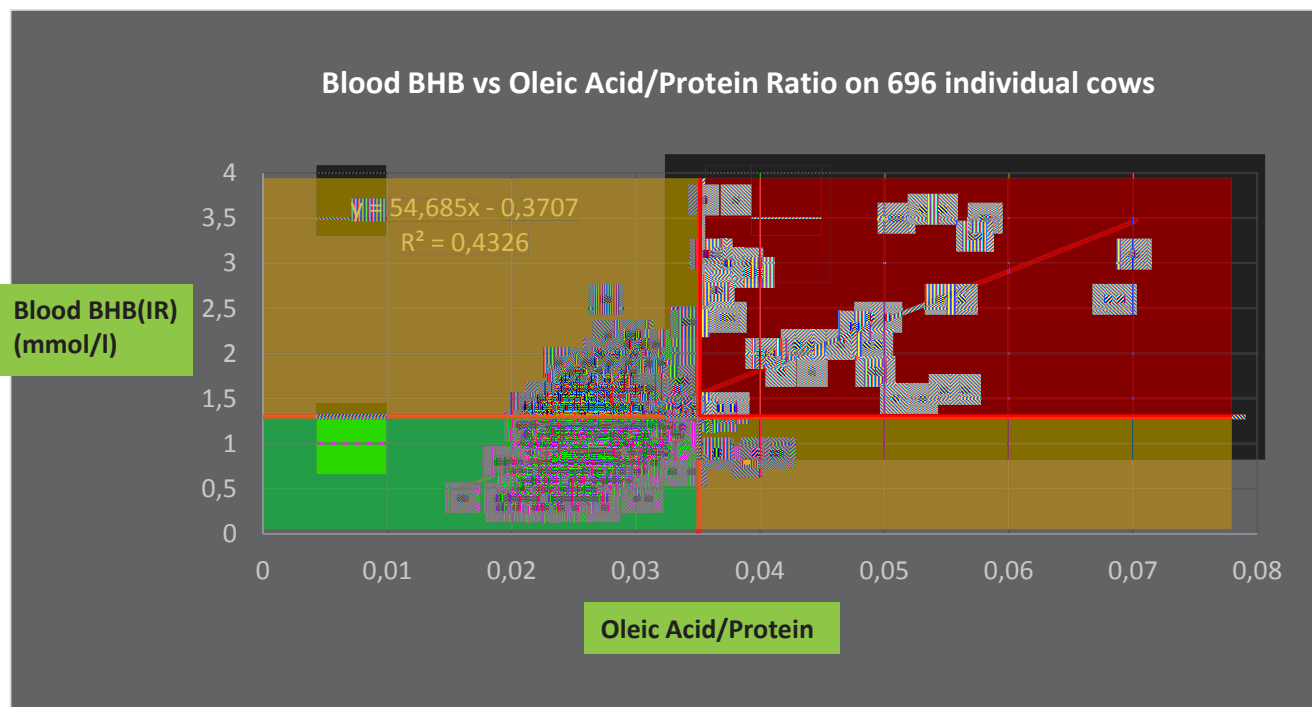


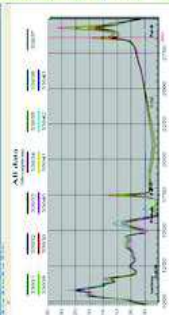
How to improve still ketosis diagnostic? A multi-dimension approach



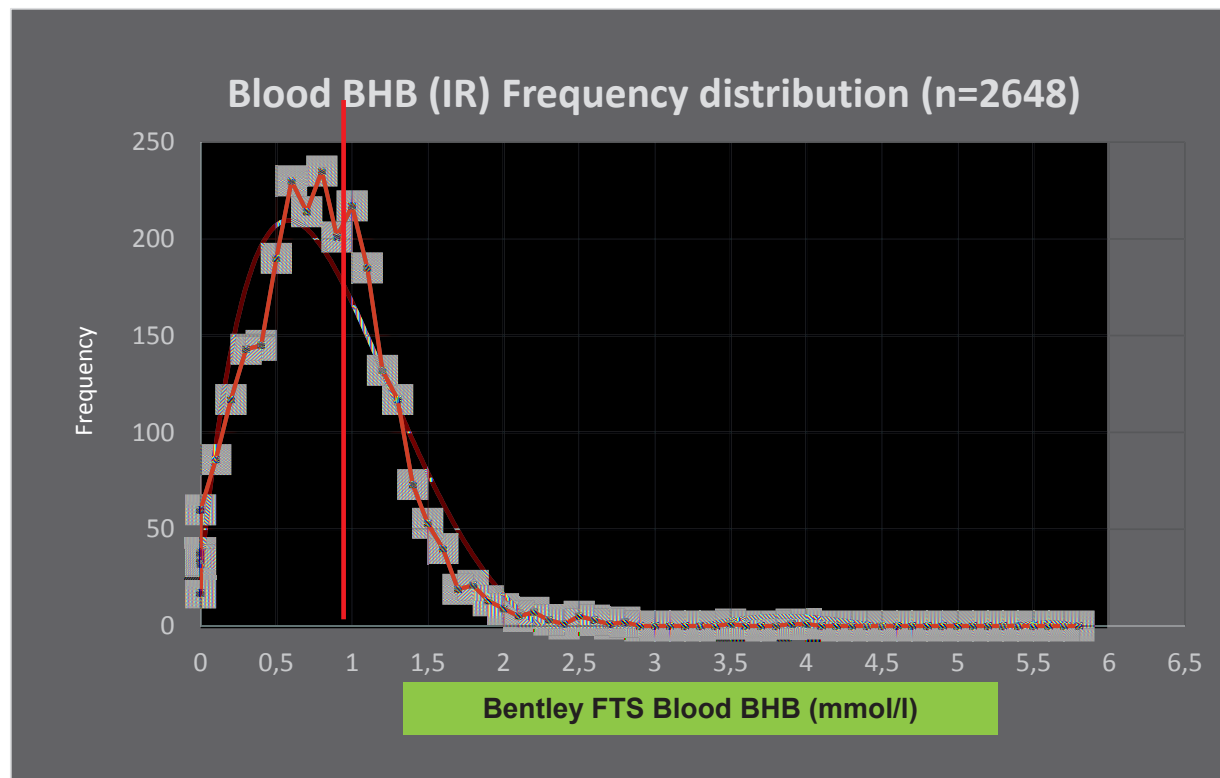


How to improve still the ketosis detection? A multi-dimension approach





Blood BHB Concentration distribution in DHIA samples



Conclusions:

- Our global metabolic spectral model is a very exhaustive and powerful approach to understand the relationship between a metabolic disorder and the milk spectra
- Blood BHB (IR), Milk BHB and Milk Fatty Acids Profile (and especially oleic acid) can successfully be used as ketosis biomarkers to improve SKC detection and to:
 - monitor individual cow Blood/FAP/Milk BHB variations over time
 - compare individual cows at herd level to develop a relative approach by setting a baseline (intra-herd) – **recommended approach**
 - to detect ketosis prevalence at herd level (inter-herds)

The Oxygen DHIA/FR laboratory has been using this model very successfully over the last 3 years with the detection of over 90% of the ketosis cases (over 10 million IR spectra collected)

- More frequent sampling protocol should be considered during early lactation to further improve diagnostic performance.



Thank you for your attention!

pbroutin@bentleyinstruments.com

www.bentleyinstruments.com

References

Broutin, P. 2013

Determination of the concentration of a component in one fluid of an animal by spectroscopic analysis of another fluid.

Patent WO 2015/055966

Duffield, T.F., D.F. Kelton,

Chain Fatty Acids in Milk Fat of Multiparous Subclinical Ketotic Cows

E. Knapp, F. Lessire, O. Dotreppe, J.L. Hornick, L. Istasse, I. Dufrasne

Farah, Vet, Faculty, University of Liege, Belgium

Link between milk fatty acids and non esterified fatty acids in the blood and its implication on the diagnosis of negative energy balance.

Hostens, M., V. Fievez, J.L.M.R. Leroy, J. Van Ranst, B. Vlaeminck, and G. Opsomer. 2012.

The fatty acid profile of subcutaneous and abdominal fat in dairy cows with left displacement of the abomasum.

J. Dairy Sci. 95:3756-376574

S. Jorjong,* A. T. M. van Knegsel,† J. Verwaeren,‡ R. M. Bruckmaier,§ B. De Baets,‡ B. Kemp,† and V. Fievez.

Milk fatty acids as possible biomarkers to diagnose hyperketonemia in early lactation

J. Dairy Sci. 98:5211-5221, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8728>

Van Haelst, Y.N.T., A. Beeckman, A. T. M. Van Knegsel, and V. Fievez. 2008

Short Communication: Elevated Concentrations of Oleic Acid and Long-Chain Fatty Acids in Milk Fat of Multiparous Subclinical Ketotic Cows

J. Dairy Sci. 91:4683-4686



CZ0002077219	0.66	1.15	0.29	0.39	0.66	4.07	3.00	3.06	4.16	199.87	18.82	67
CZ0002077619	0.73	1.30	0.35	0.52	1.01	6.38	1.73	2.46	6.25	149.90	18.83	75
CZ0002078269	0.66	1.05	0.31	0.44	0.83	5.81	6.30	9.74	3.12	136.37	14.46	7
CZ0002079139	0.68	1.05	0.29	0.40	0.73	4.07	4.64	3.99	4.16	175.93	16.19	85

Ketosis Detection

A New Probabilistic Approach

Jan Riha

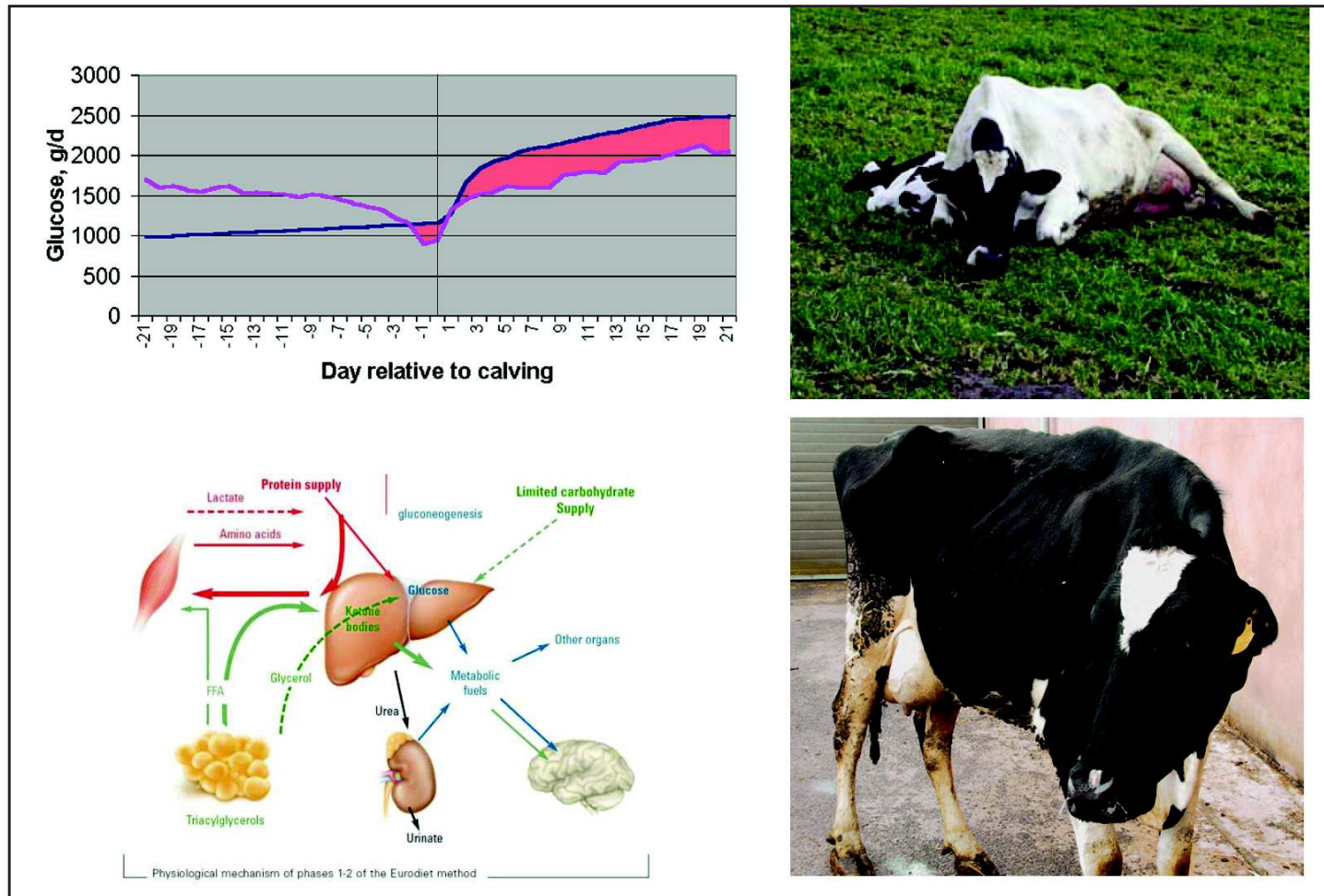
Bentley Users Seminar & Group Meeting
Aarhus, Denmark, 7th - 10th November, 2016

Ketosis

is disease caused by negative energetical disbalance between income energy and energy needed

- indicated in post-partum period - the most critical in the first 100 days of lactation (40 days)
- caused by significant increase of milk production after calving - consumption a lot of energy
- causes fertility problems, displacement of abomasums etc.
- has clinical and subclinical stage
- prevalence of ketosis is ~41 % of dairy cows in the first 9 weeks of lactation ⇒ ketosis is the second most important issue in dairy production

Ketosis



Ketosis Detection =

Genetics

- Parents
- Specific genotype - DNA

+ Metabolic state of cow

- On farm screening & detection – KetoTest

+ Lactation & milk yield effect

- Day of lactation, no. of lactation

+ Farm effect

- Farm management issues and decisions
- Feeding

+ Season/Specific conditions effect

+ error

- A New Probabilistic Approach
Ketosis Detection using
- FTIR instruments &
 - Animal Recording data & Samples

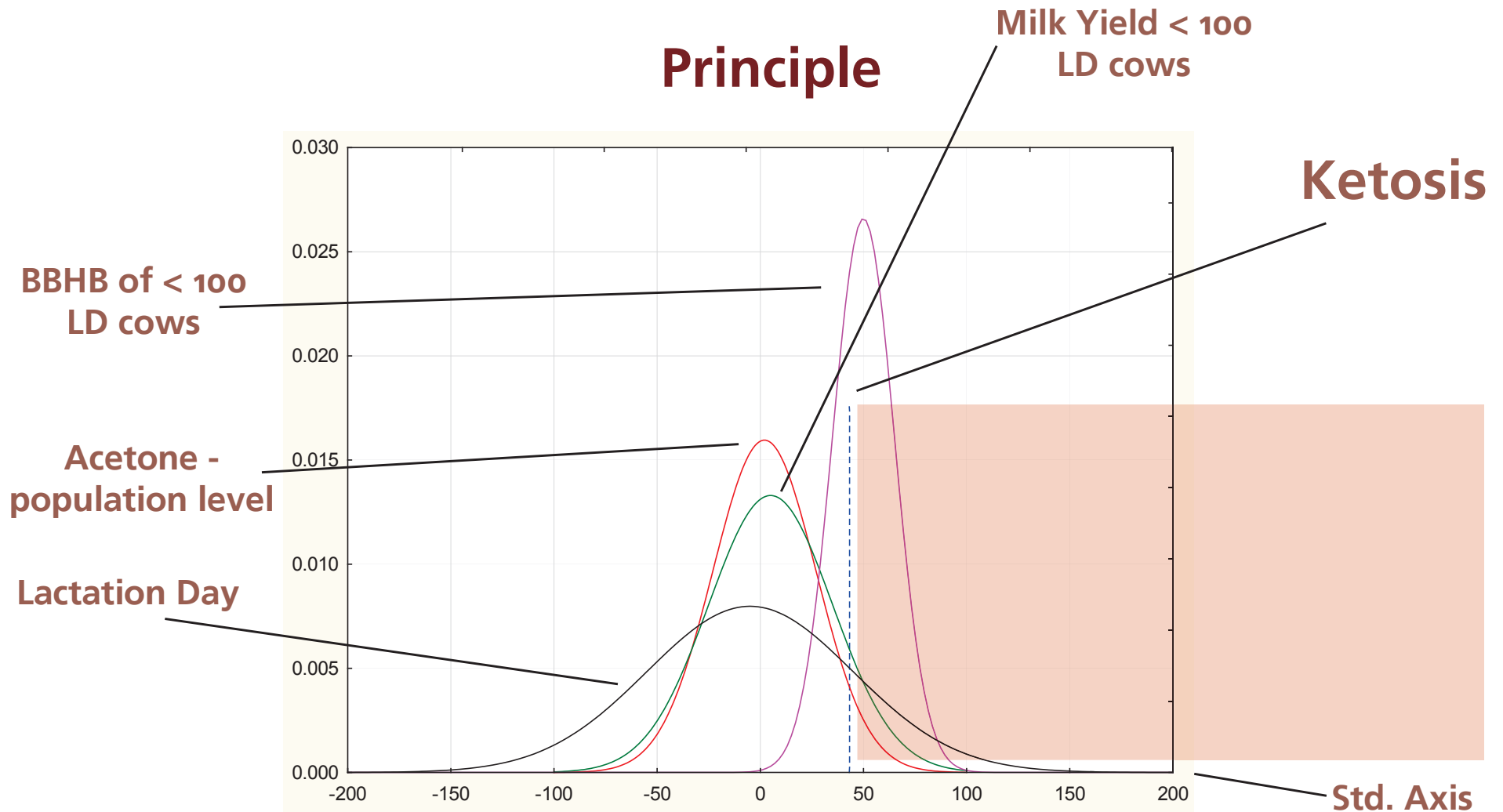
Ketosis Detection - Probabilistic Approach

Main Goals

- usage of milk recording samples & automated SW solution
 - overview of herd situation in time, monthly based report, animal recording data, no additional sampling&costs, to give a new tool for farm management
- to combine different group of parameters to increase probability of detection
 - animal recording data, ketosis related results, milk components ratios
- minor milk components calibrations related to ketosis
 - Aceton, BHB, BBHB, OA, CA, sampling frequency related calibrations

Ketosis Detection - Probabilistic Approach

Principle



Ketosis Detection - Czech Example

Experiment & Data Description

- Farms
 - 13 farms; >300 dairy cows; March, April, May 2015 combine different group of parameters to increase probability of detection
- Parameters | Effects
 - ID, Date of AR, TTA, Lactation Day, Milk Yield, Fat, Protein, Lactose, TS, SNF, Urea, FPD, pH, Caseine, FFA, Citric Acid, Oleic Acid, Acetone, BBHB, BHB, BHB GC, F/P, F/TS, F/SNF, F/L, logAC24, logAC48, SCC, Lactation Group
- Report using A New probabilistic Approach - farm evaluation

Data description

Farm ID	Farm	March 2015		April 2015		May 2015		Total
		No. of Animals	TTA	No. of Animals	TTA	No. of Animals	TTA	No. Of Animals
530200811	ZD Sloupnice, Dolní Sloupnice	472	3	528	2	533	2	1533
530203811	Letohradská ZS, Lukavice	426	3	482	3	494	4	1402
610335779	LUKA a.s., Vysoké Studnice	553	2	568	2	580	4	1701
610527911	AGRAS Bohdalov	654	3	660	2	662	4	1976
610539211	ZERAS Radostín, Radostín	586	3	615	2	622	2	1823
610539349	ZERAS Radostín, Pavlov	606	2	625	2	620	5	1851
620135959	ZOD Rybníček	772	3	773	3	736	4	2281
710209012	Libinská AGRO, Šumvald	1135	2	1111	3	1091	4	3337
720241111	Agroječmínek, Chropyně	916	2	1006	2	1009	2	2931
810165935	Starojicko Jičina	461	2	461	3	606	2	1528
530201371	ZD Sloupnice, Řetězová	227	2	243	3	238	2	708
710207341	Senice na Hané	1127+464	2	452	2	459	3	2502
530197774				209	2			
Total		7272		7733		7650		23573

Data description - 2

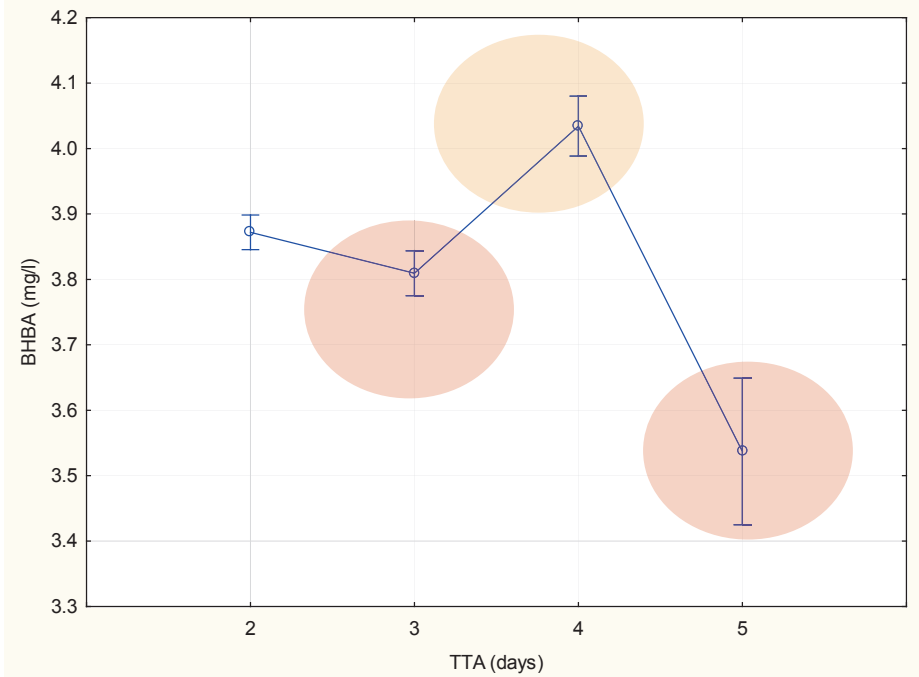
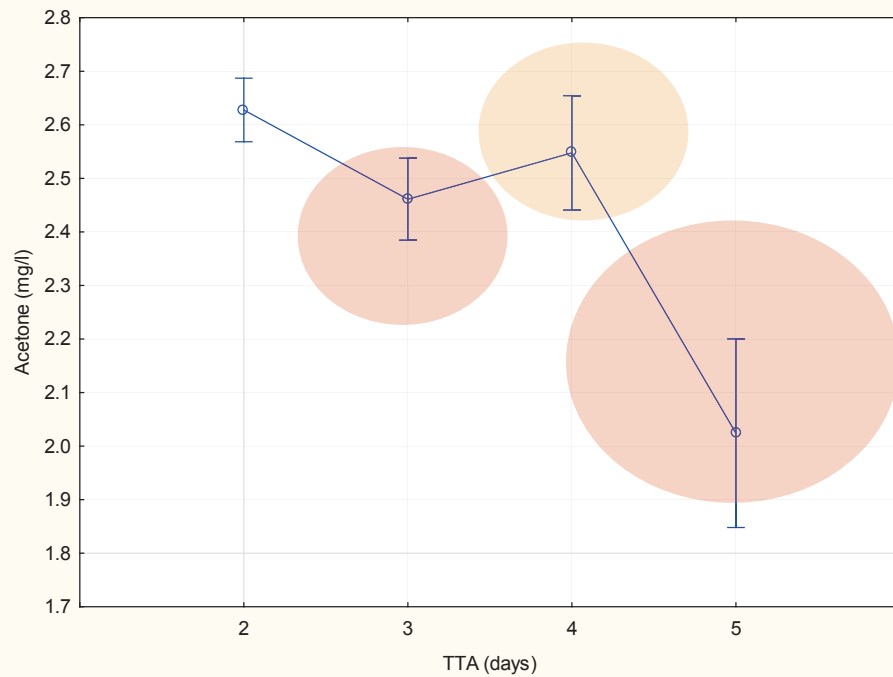
	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
TTA (days)	2.69	2.00	5.00	0.82
Lactation day	182.22	0.00	926.00	110.20
Milk Yield (kg)	36.59	0.00	101.00	15.74
Fat (%)	3.62	0.07	9.94	0.73
Protein (%)	3.37	1.32	5.71	0.32
Lactose (%)	4.98	1.29	5.80	0.25
Total Solids (%)	12.35	3.79	18.97	0.86
SNF(%)	8.98	3.22	10.49	0.35
Urea (mg/l)	29.83	0.00	69.80	4.60
FPD	540.78	164.00	581.00	9.53
pH	6.49	5.69	6.78	0.06
Caseine	2.63	1.01	4.33	0.25
FFA	0.36	-12.62	6.80	0.76
Citric Acid (%)	0.18	0.07	0.38	0.03
BHBA (mg/l)	3.87	0.00	17.70	1.47
BHBB (mg/l)	164.11	17.70	661.04	37.26
BHB GC (mg/l)	16.09	2.79	65.17	3.28
OA (%)	0.59	0.05	2.85	0.16
Acetone (mg/l)	2.13	0.00	18.01	1.45
logAc2	0.55	-0.74	6.69	0.25
logAc3	0.55	-0.72	2.74	0.23
SCC	245.69	0.00	9500.00	606.44
LactG	0.74	0.00	1.00	0.44

Ketosis Detection - Czech Example

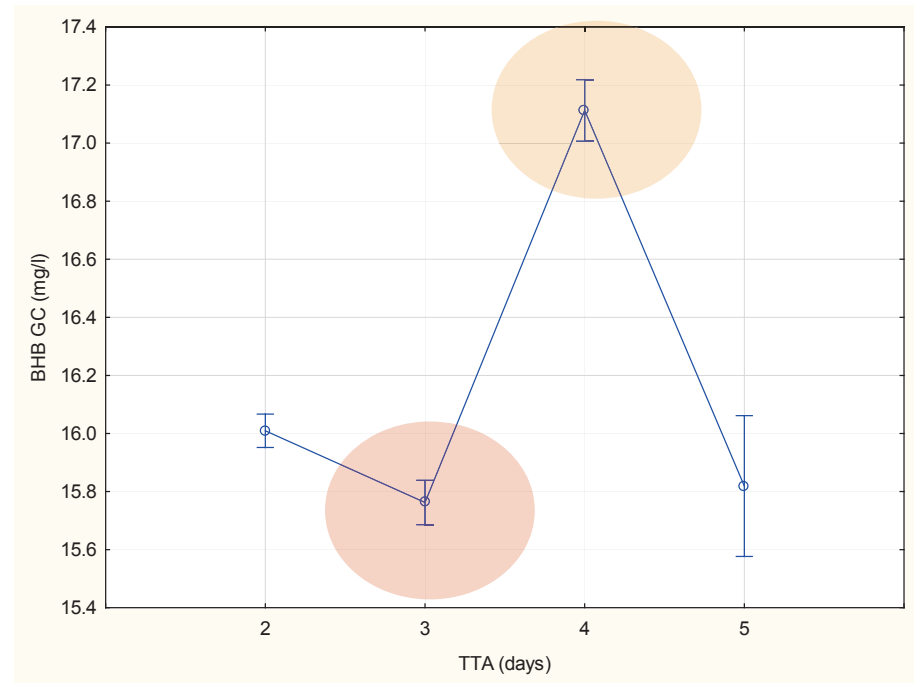
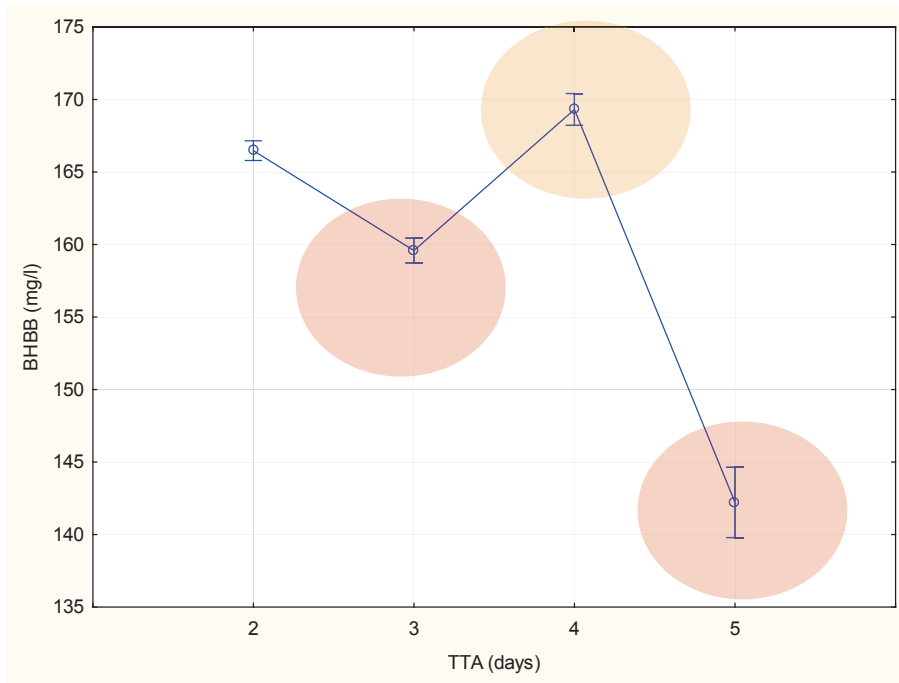
Model no. 1

- Citric Acid | Oleic Acid | Acetone | BBHB | BHB | BHB GC | logAC24 | logAC48 =
 - Lactation Group + FarmID + TTA
- Answers on:
 - how are keton bodies results depent on TTA?
 - differencies between Lactation Groups (more - 1 & less - 0 than 100 days)?
 - differencies between farms - Farm Effect?

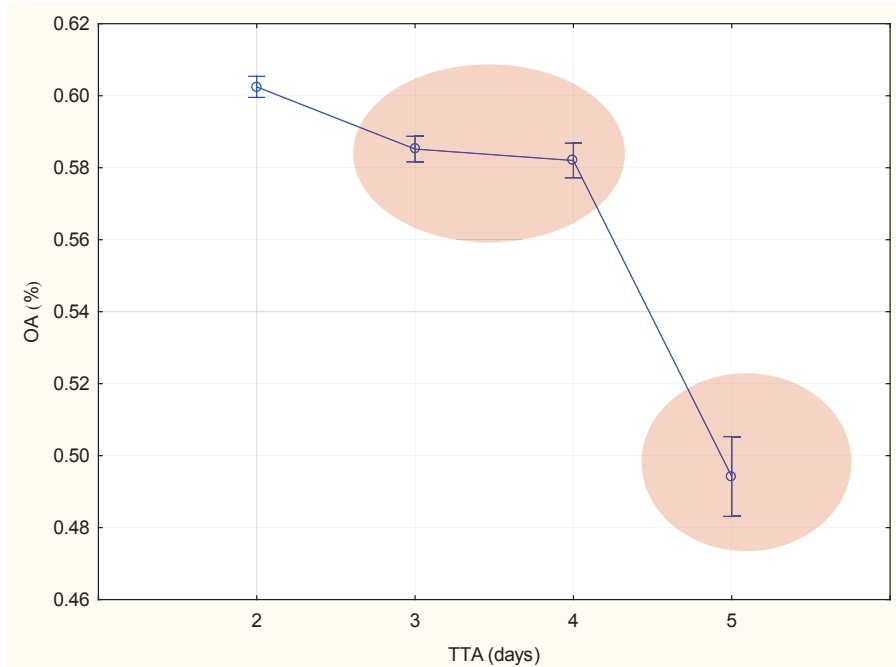
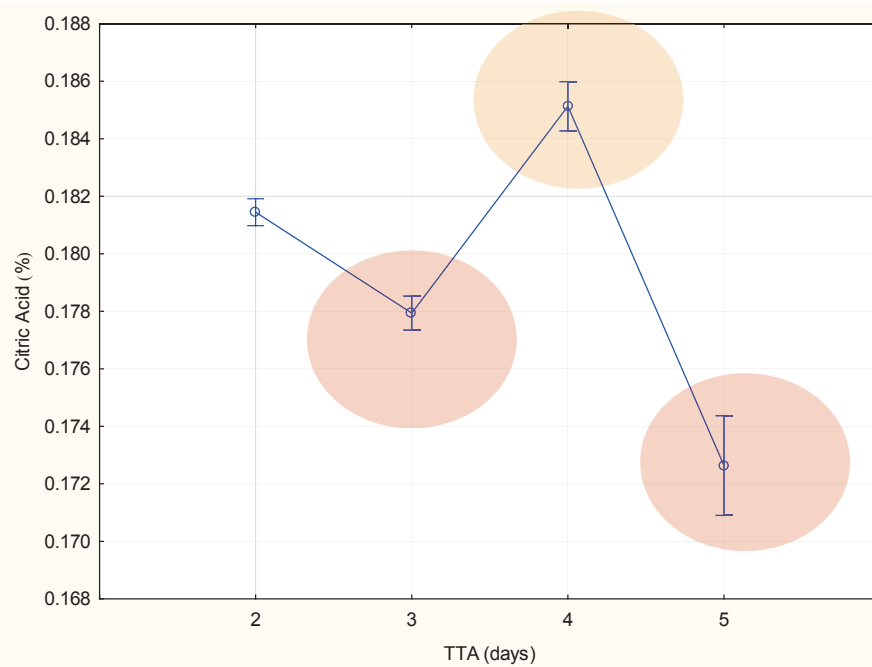
How do keton bodies results depend on TTA?



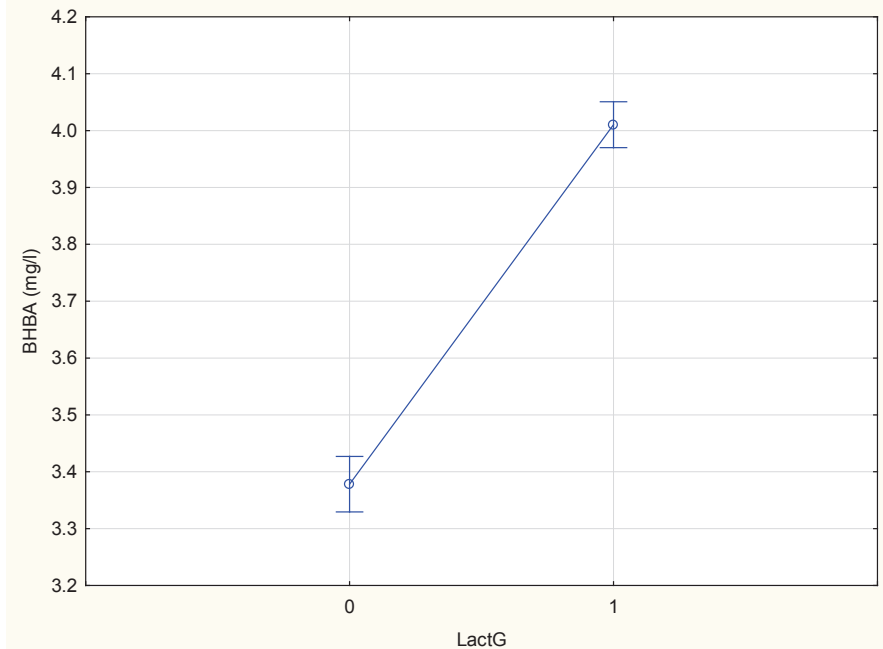
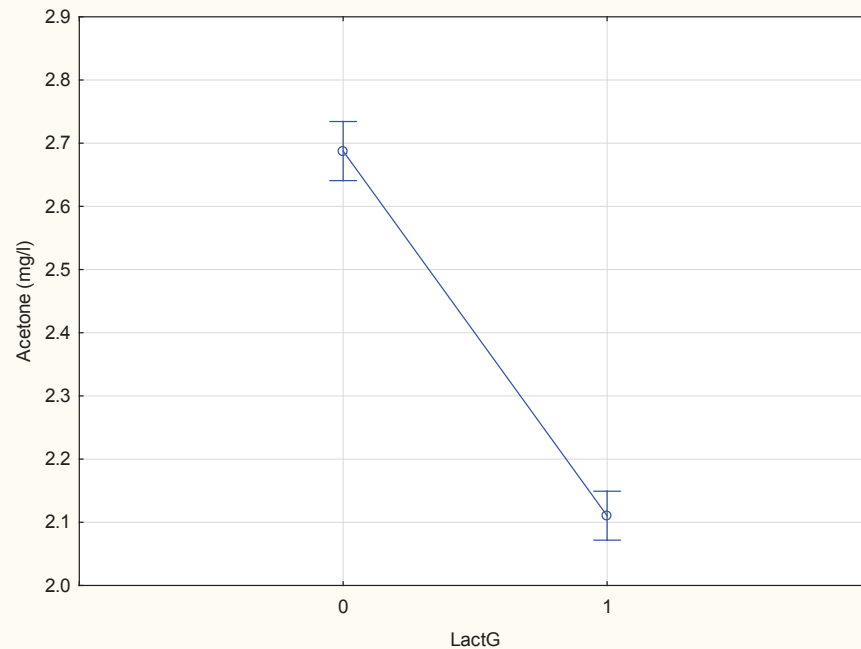
How do keton bodies results depend on TTA?



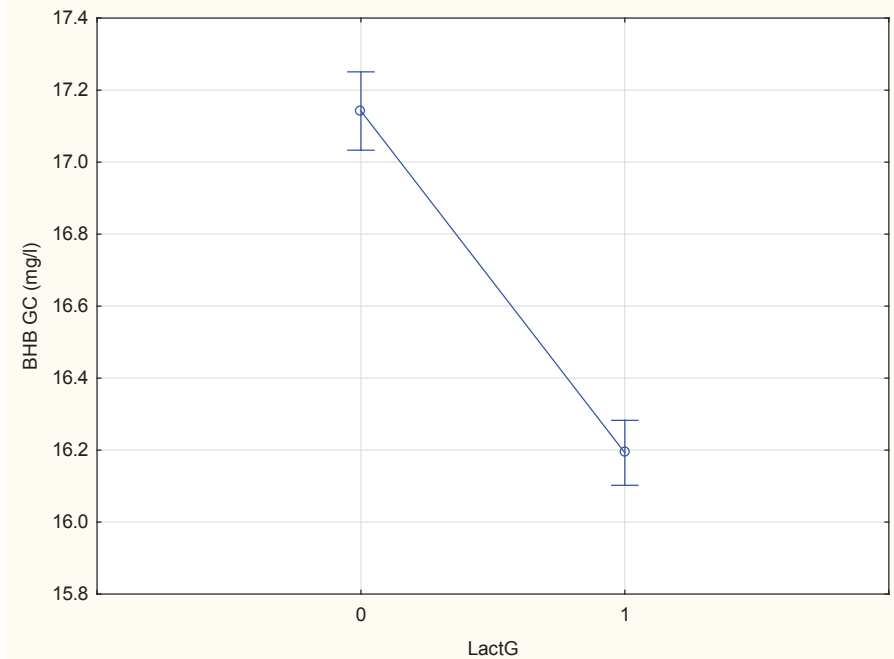
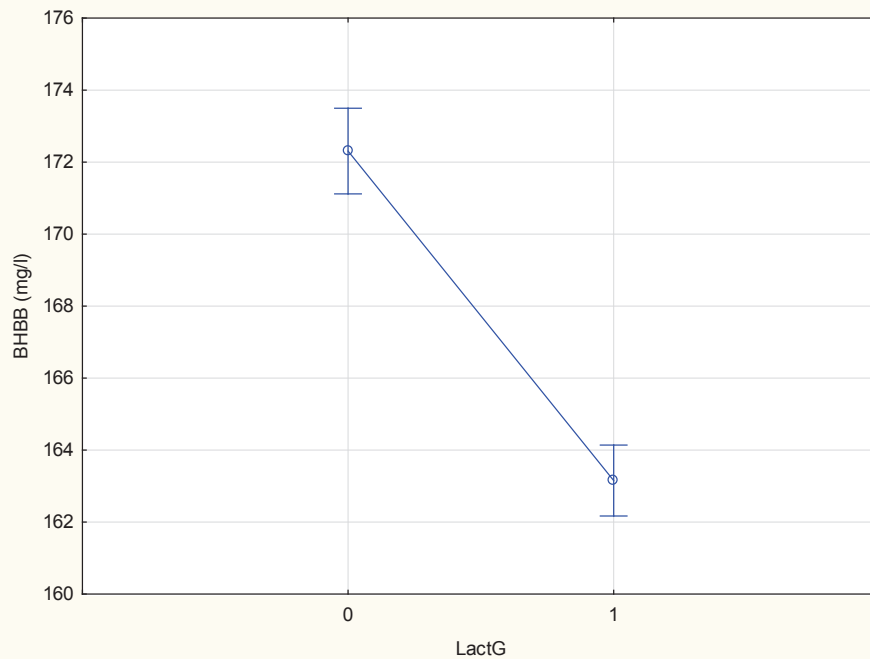
How do keton bodies results depend on TTA?



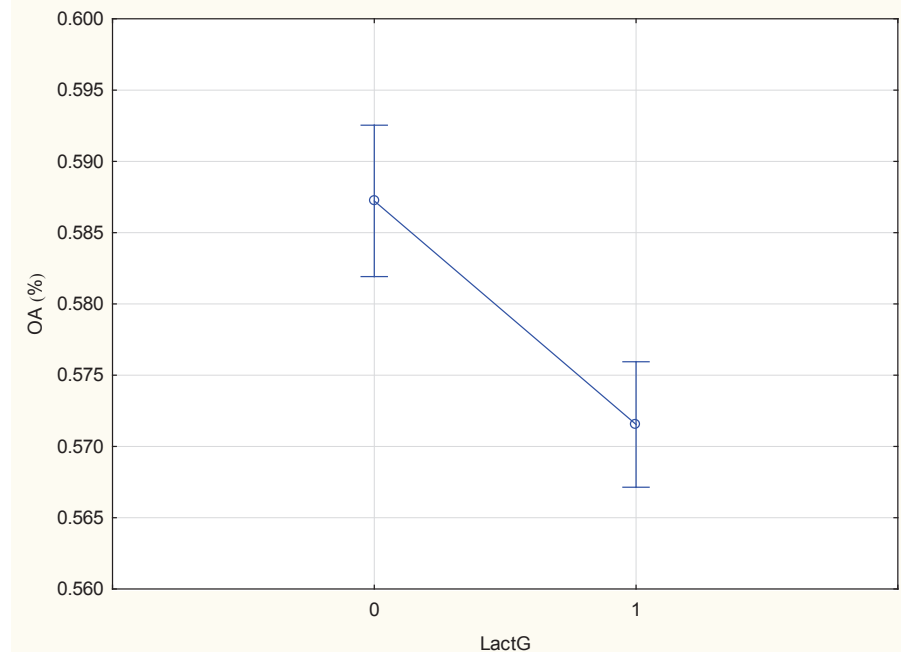
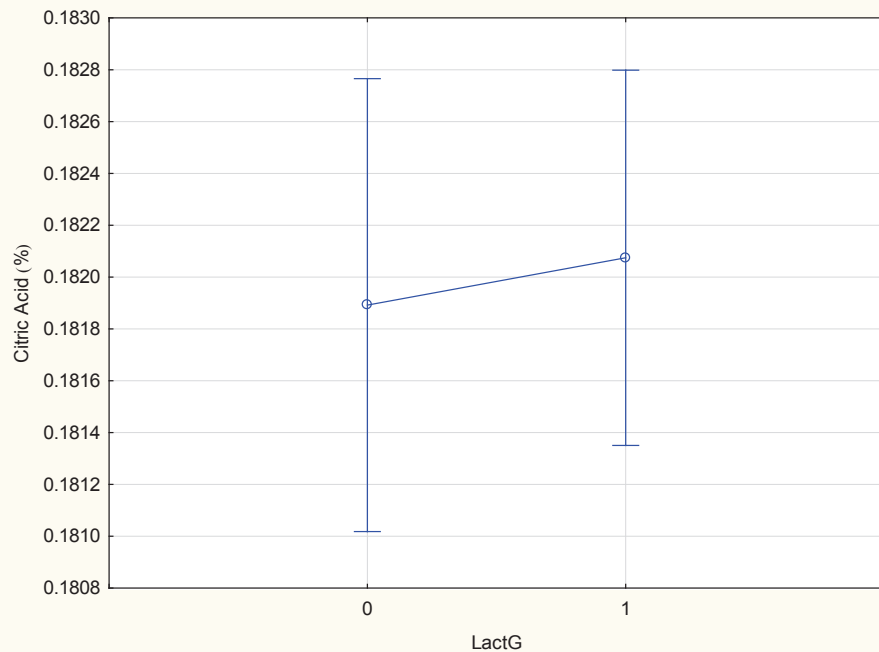
Differences between Lactation Groups (more - 1 & less - 0 than 100 days)?



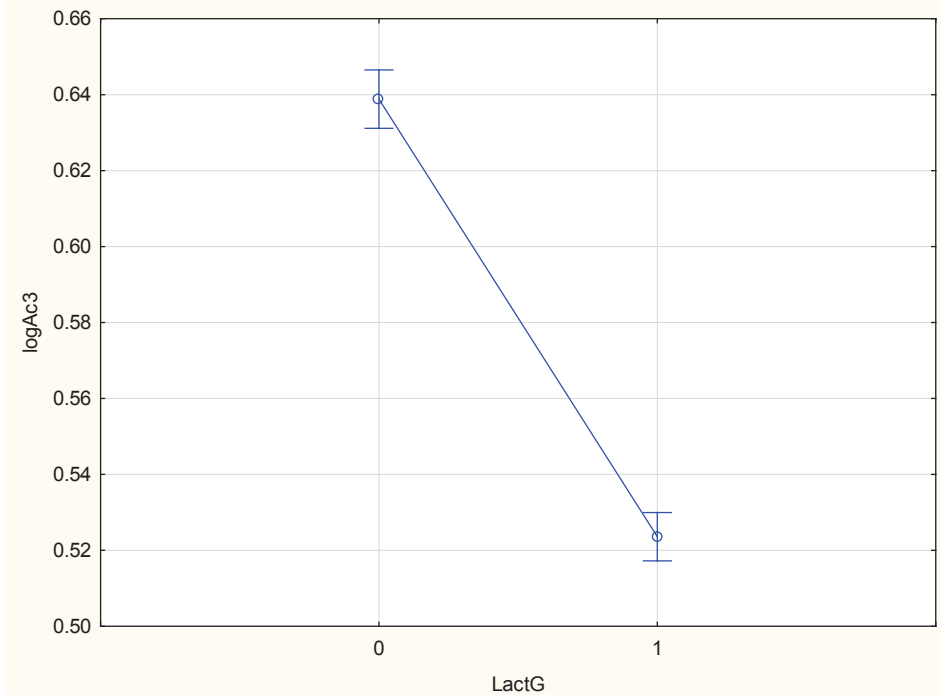
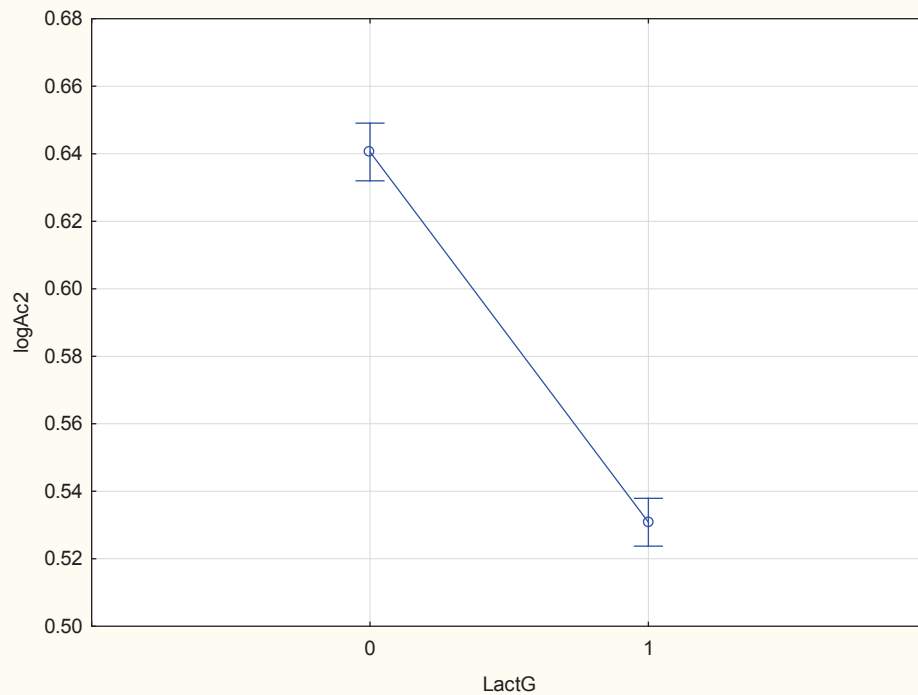
Differences between Lactation Groups (more - 1 & less - 0 than 100 days)?



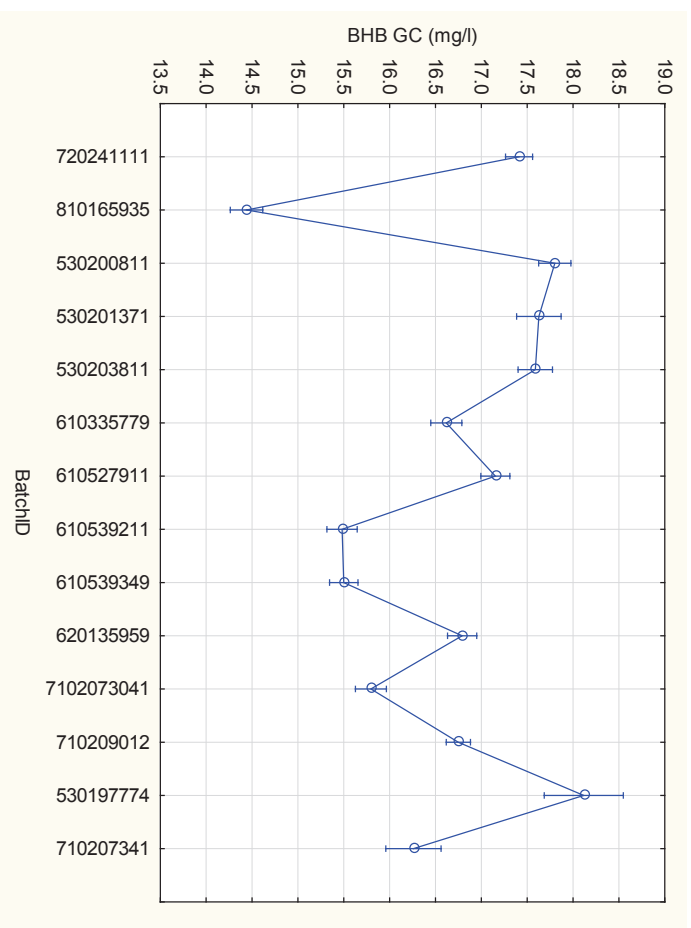
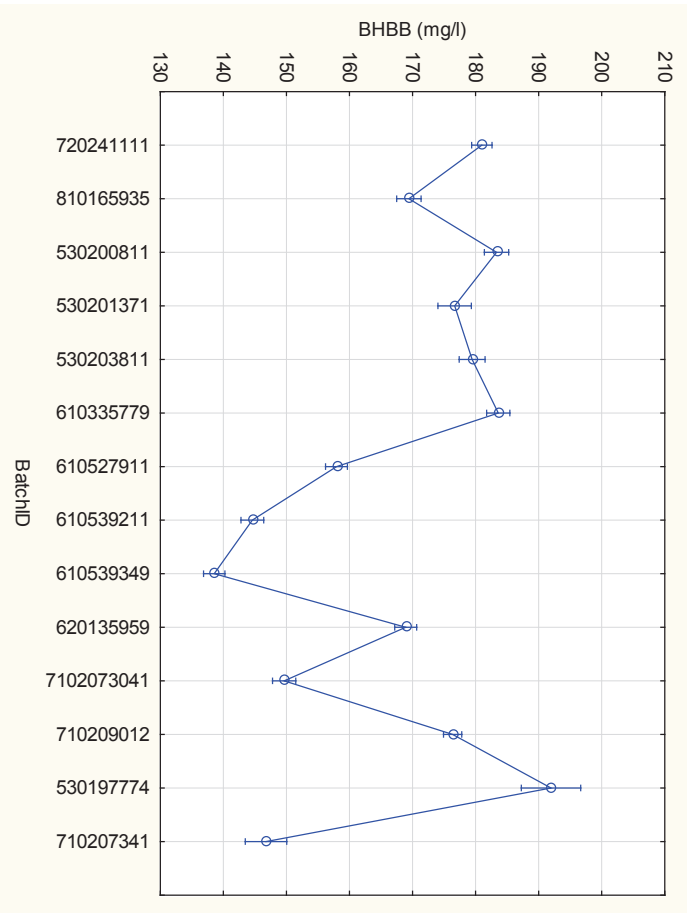
Differences between Lactation Groups (more - 1 & less - 0 than 100 days)?



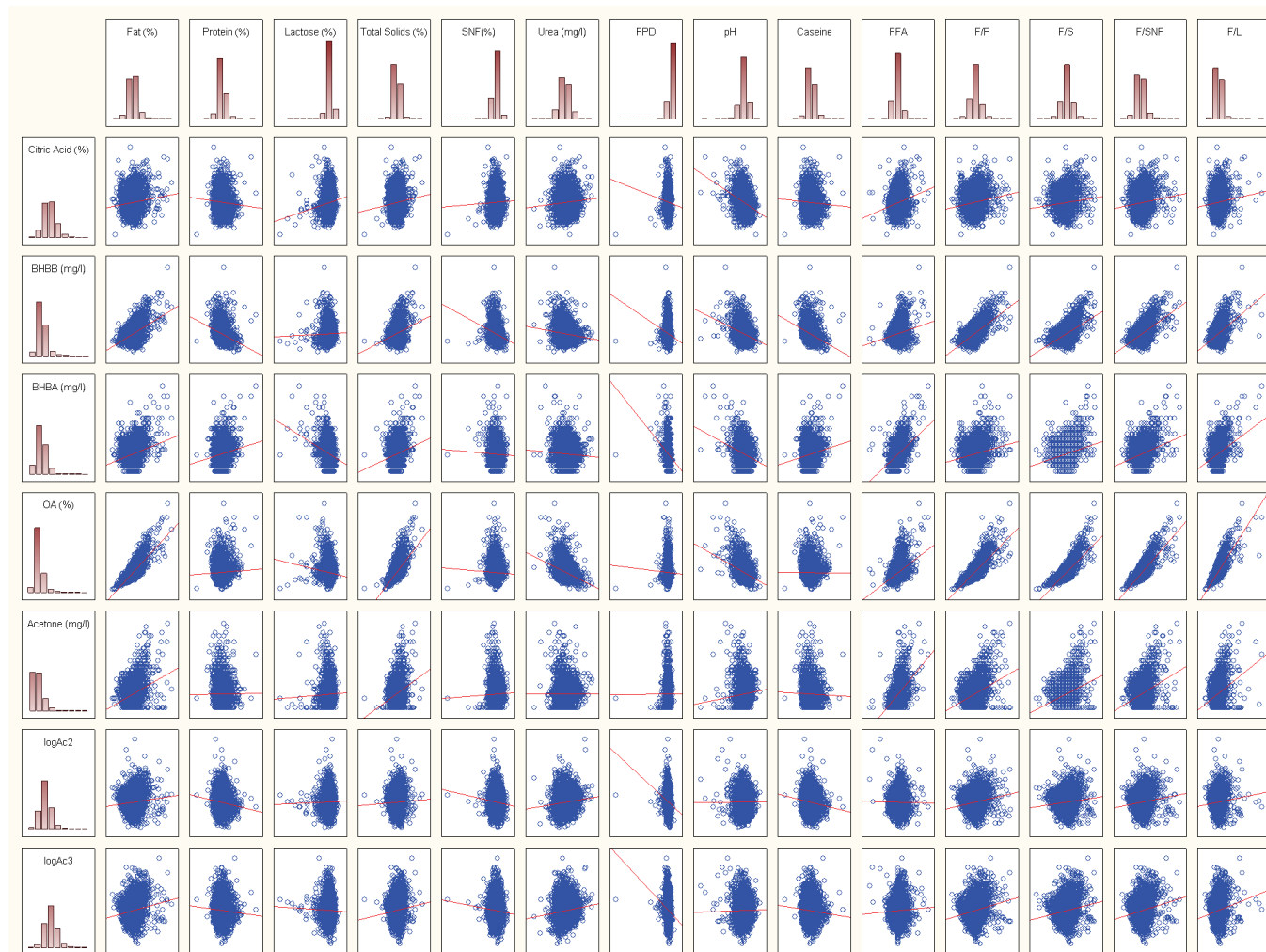
Differences between Lactation Groups (more - 1 & less - 0 than 100 days)?



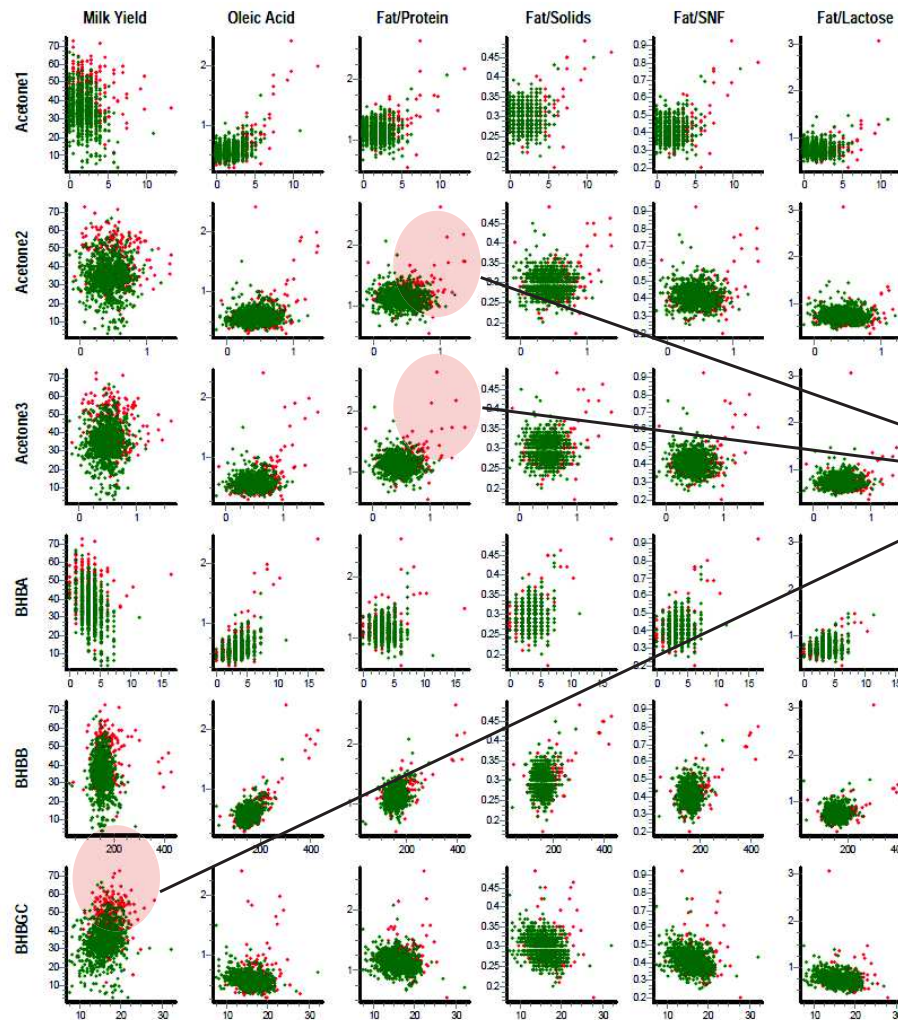
Differences between farms - Farm Effect??



Correlations between AR data & Ketone bodies in < 100 Lactation Group

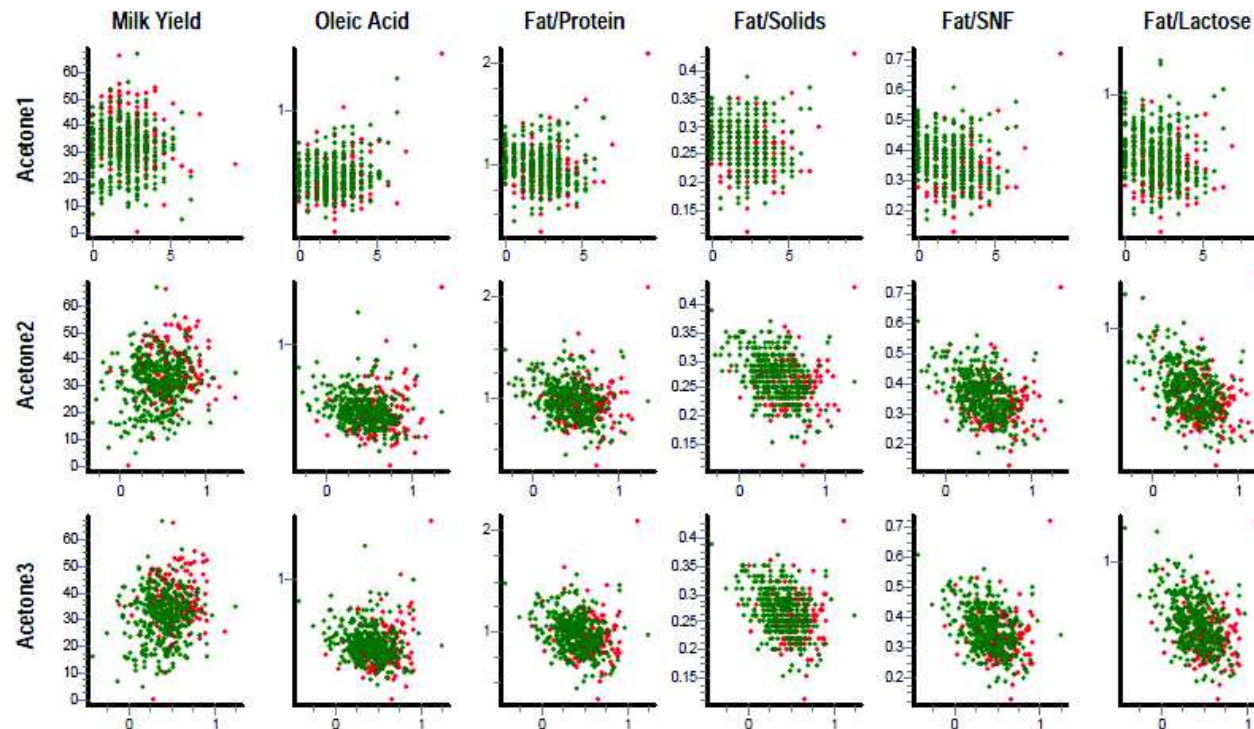


Detailed Farm Results - Discussion



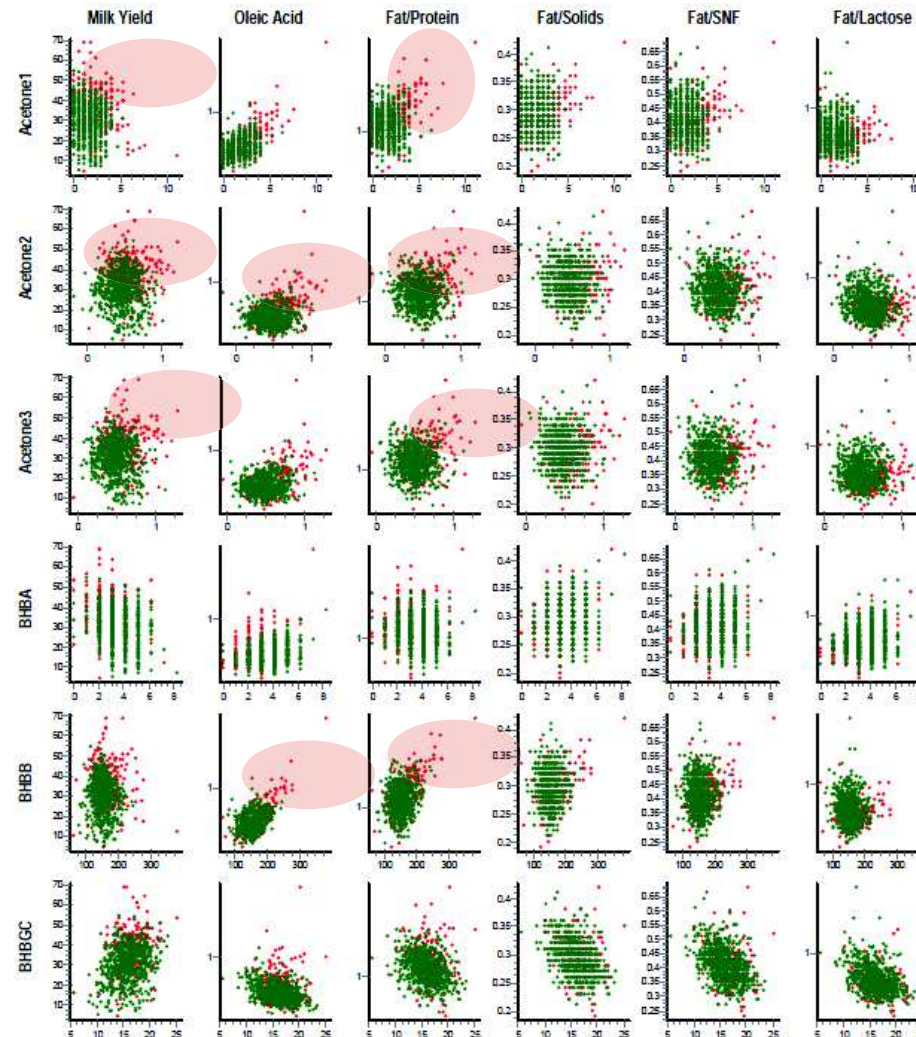
- Typical farm with couple of cows with ketosis
 - "Random" occurrence of ketosis

Detailed Farm Results - Discussion



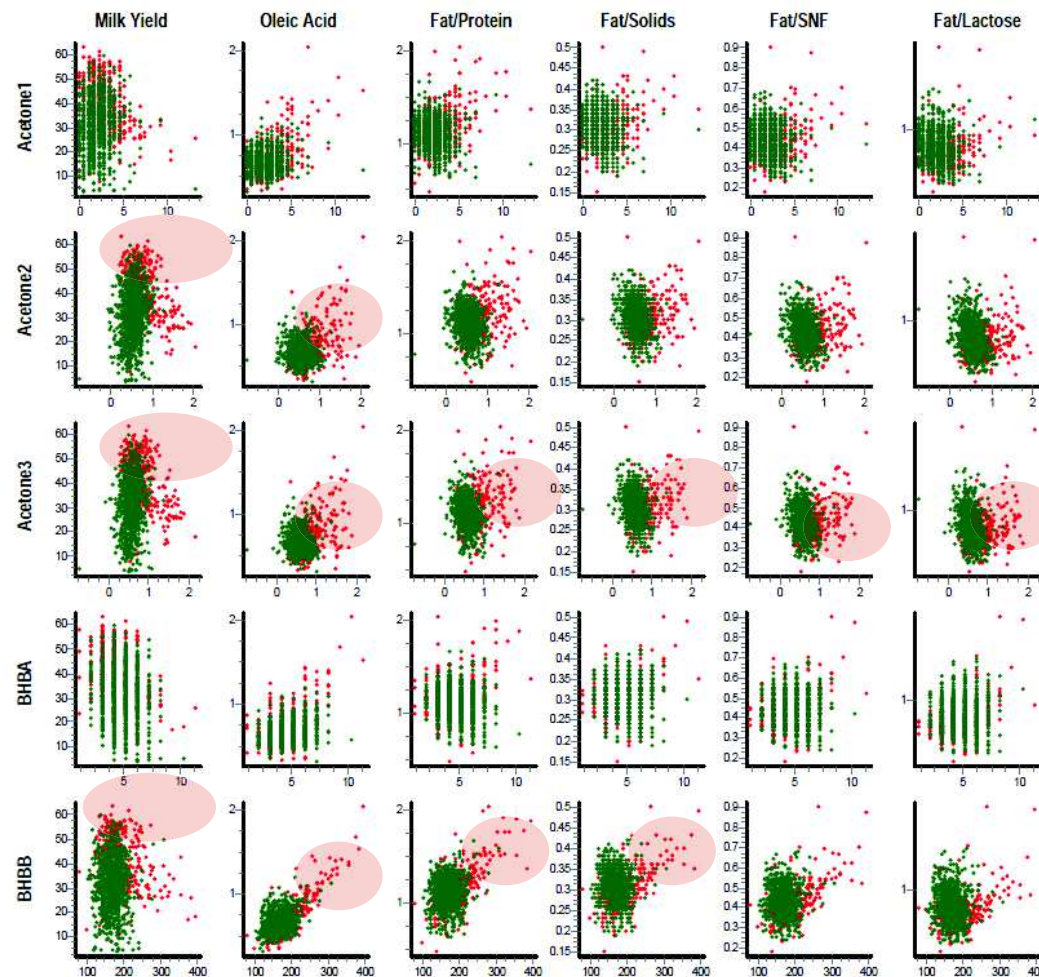
- Farm with no occurrence of ketosis
- Lact. Group 0 = Lact. Group 1

Detailed Farm Results - Discussion



- Feeding problem
 - Protein part of feeding could resolve situation

Detailed Farm Results - Discussion



- General feeding problem expressed on Lact. Group 0
- Lact. Group 0 is separated by keton bodies content and milk yield



Ketosis Detection

A New Probabilistic Approach

Farm Report - I



Ketosis Farm& Individual Cow Report

21. 06. 2015

Farm ID: 810165935

Selected month for detailed report:

5-2015

Time Period
2-2013
3-2013
4-2013
5-2013
6-2013
7-2013
8-2013
9-2013
10-2013
11-2013
12-2013
1-2014
2-2014
3-2015
4-2015
5-2015



Ketosis Detection

A New Probabilistic Approach

Farm Report - II - Summary

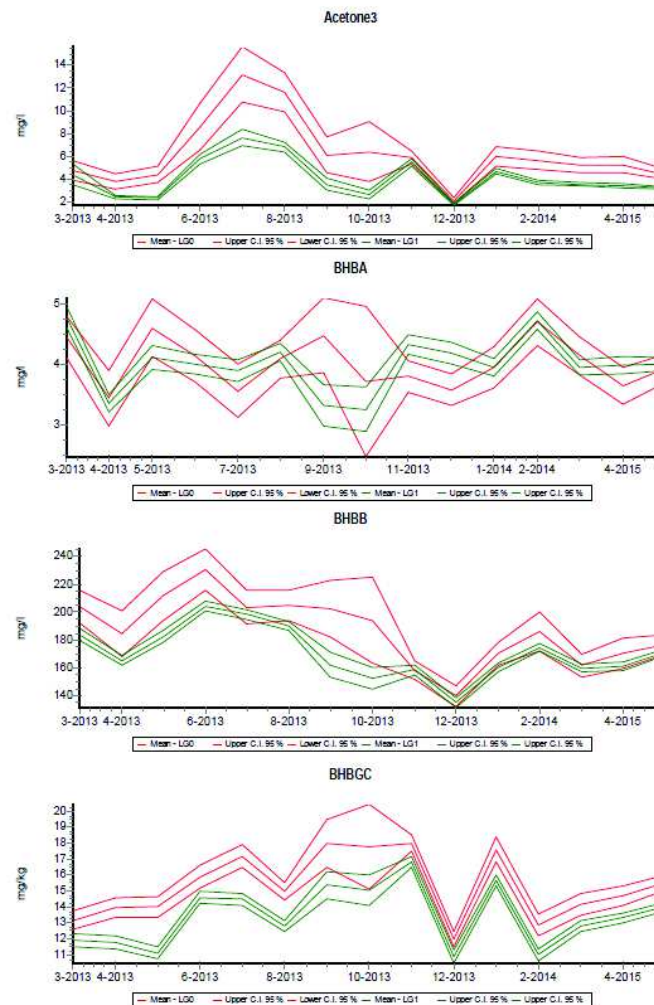
Summary Table - Lactacion group < 100 days - time period

Month	Mean Values												
	Count	Milk Yield (l)	OA %	F/P	F/S	F/SNF	F/L	Ac1 (mg/l)	Ac2 (mg/l)	Ac3 (mg/l)	BHBA (mg/l)	BHBB (mg/l)	BHBGC (mg/kg)
3-2013	118	32.88	0.88	1.29	0.31	0.48	0.85	3.71	6.00	4.79	4.46	203.82	13.19
4-2013	102	32.96	0.74	1.16	0.28	0.42	0.74	2.81	5.26	3.82	3.44	184.45	13.99
5-2013	105	30.25	0.91	1.28	0.31	0.47	0.84	3.86	4.54	4.45	4.61	211.77	14.02
6-2013	84	31.06	0.88	1.25	0.30	0.46	0.82	4.27	9.90	8.61	4.15	230.88	15.92
7-2013	99	34.00	0.77	1.15	0.29	0.43	0.78	4.78	13.73	13.15	3.56	203.62	17.20
8-2013	128	30.98	0.84	1.28	0.31	0.47	0.84	4.75	10.97	11.57	4.09	204.89	15.02
9-2013	13	33.92	0.83	1.31	0.35	0.50	0.91	4.47	5.85	6.15	4.48	202.43	18.01
10-2013	7	37.36	0.81	1.24	0.34	0.47	0.84	4.23	7.76	6.42	3.72	194.37	17.80
11-2013	126	34.89	0.71	1.15	0.33	0.45	0.82	4.50	6.80	5.96	3.80	188.41	18.03
12-2013	119	34.93	0.72	1.17	0.30	0.45	0.83	4.11	3.16	2.17	3.68	139.81	12.00
1-2014	109	34.67	0.72	1.20	0.34	0.47	0.86	3.86	5.70	6.01	3.95	170.25	17.60
2-2014	96	32.55	0.86	1.25	0.32	0.48	0.87	4.68	4.22	5.87	4.71	186.18	12.90
3-2015	104	33.17	0.66	1.04	0.29	0.40	0.73	3.47	4.93	5.22	4.14	161.68	14.17
4-2015	96	35.31	0.70	1.13	0.30	0.42	0.74	3.36	4.88	5.30	3.84	170.52	14.71
5-2015	136	35.06	0.66	1.11	0.29	0.39	0.69	4.13	4.55	4.44	3.93	176.79	15.58
Totals/Avg	1442	33.60	0.78	1.20	0.31	0.45	0.81	4.07	6.54	6.25	4.02	186.65	15.34

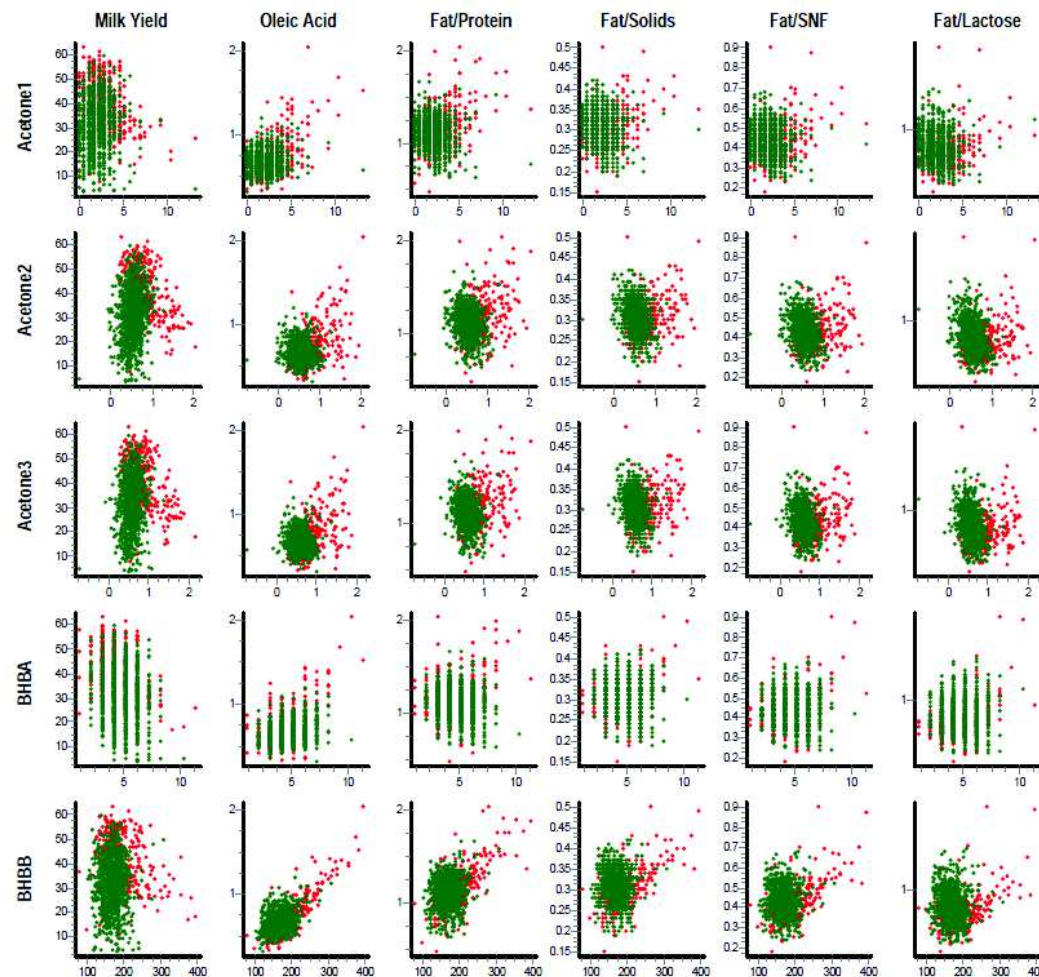
Summary Table - Lactacion group > 100 days - time period

MESIC	Mean Values												
	Count	Milk Yield (l)	OA %	F/P	F/S	F/SNF	F/L	Ac1 (mg/l)	Ac2 (mg/l)	Ac3 (mg/l)	BHBA (mg/l)	BHBB (mg/l)	BHBGC (mg/kg)
3-2013	311	23.74	0.81	1.19	0.31	0.47	0.87	2.99	5.93	4.44	4.79	184.21	11.92
4-2013	304	25.22	0.71	1.11	0.29	0.43	0.80	1.67	3.08	2.51	3.36	165.23	11.79
5-2013	304	25.66	0.78	1.13	0.29	0.44	0.81	2.39	2.56	2.39	4.11	182.59	11.13
6-2013	317	25.70	0.75	1.12	0.29	0.43	0.79	3.31	7.12	5.82	4.01	204.35	14.61
7-2013	294	24.69	0.74	1.06	0.29	0.42	0.78	3.81	8.67	7.67	3.90	198.42	14.50
8-2013	285	24.94	0.78	1.13	0.30	0.45	0.85	3.21	6.84	6.84	4.21	190.00	12.83
9-2013	32	28.52	0.69	1.14	0.34	0.46	0.88	1.94	4.21	3.58	3.32	162.27	15.39
10-2013	24	23.76	0.88	1.14	0.34	0.47	0.90	1.65	3.23	2.69	3.25	152.38	15.04
11-2013	303	25.40	0.74	1.12	0.34	0.46	0.89	3.51	6.52	5.54	4.33	158.60	16.87
12-2013	305	25.56	0.72	1.11	0.30	0.46	0.89	3.00	2.78	1.87	4.19	135.00	10.90
1-2014	325	26.44	0.72	1.14	0.35	0.47	0.90	2.56	4.62	4.71	3.96	160.25	15.89
2-2014	347	25.89	0.79	1.13	0.31	0.46	0.87	3.51	3.00	3.76	4.73	174.70	11.02
3-2015	357	26.60	0.66	1.07	0.30	0.42	0.79	2.07	3.82	3.59	3.95	159.72	12.80
4-2015	365	25.95	0.69	1.11	0.31	0.44	0.82	2.11	3.44	3.49	4.00	160.95	13.35
5-2015	470	28.90	0.68	1.10	0.30	0.42	0.76	3.29	3.78	3.27	4.01	171.41	14.05
Totals/Avg	4343	25.67	0.73	1.12	0.31	0.45	0.84	2.73	4.64	4.14	4.01	176.67	13.46

Farm Report - II - Overview



Detailed Farm Results - Correlations





Ketosis Detection

A New Probabilistic Approach

Farm Report - II - Individual Report

Individual cow (lactation day<100) report based on actual month computed limits.

ID	Result under 50 % quantile				Result under 75 % quantile			Result under 85 % quantile		Result above 85 % quantile		Lact. Day
	OA	F/P	F/S	F/SNF	F/L	Ac1	Ac2	Ac3	BHBA	BHBB	BHBGC	
CZ0001377459	0.94	1.31	0.33	0.48	0.86	5.23	6.42	6.53	2.29	236.27	19.61	41
CZ0001780929	0.55	1.02	0.27	0.36	0.64	3.49	3.05	2.48	3.12	157.19	12.42	40
CZ0001781339	0.84	1.07	0.31	0.43	0.83	4.07	2.32	2.58	5.20	139.49	18.29	92
CZ0001912489	0.61	0.84	0.25	0.33	0.62	3.49	5.41	4.25	4.16	163.44	16.38	59
CZ0001913649	0.54	1.05	0.27	0.36	0.61	1.74	4.85	4.16	3.12	175.93	16.73	87
CZ0001913759	0.92	1.48	0.34	0.49	0.94	6.97	4.84	3.74	4.16	240.41	14.88	85
CZ0001913939	0.57	0.83	0.23	0.29	0.50	3.49	5.67	4.42	3.12	160.31	14.79	80
CZ0002030729	0.53	0.99	0.26	0.35	0.61	2.90	1.73	1.70	2.08	159.27	16.60	62
CZ0002031209	0.64	1.07	0.28	0.38	0.66	4.85	2.83	2.62	2.08	159.27	14.07	56
CZ0002077199	0.66	0.62	0.25	0.32	0.55	2.90	3.32	3.23	4.16	213.40	18.94	39
CZ0002077219	0.66	1.15	0.29	0.39	0.66	4.07	3.00	3.06	4.16	199.57	18.82	67
CZ0002077619	0.73	1.30	0.35	0.52	1.01	6.39	1.73	2.46	6.25	149.90	18.83	75
CZ0002078289	0.68	1.05	0.31	0.44	0.83	5.81	0.90	0.74	3.12	136.37	14.46	7
CZ0002079139	0.68	1.08	0.29	0.40	0.73	4.07	4.64	3.99	4.16	175.93	16.19	85
CZ0002079469	0.56	1.15	0.29	0.39	0.67	2.90	2.86	2.27	2.08	169.68	11.89	85
CZ0002079509	0.67	1.15	0.31	0.44	0.80	4.07	1.90	2.14	2.08	92.55	12.21	14
CZ0002079649	0.34	0.76	0.22	0.28	0.51	4.85	2.59	2.62	3.12	120.76	17.60	78
CZ0002079659	0.55	1.02	0.28	0.38	0.70	2.90	3.15	3.11	3.12	129.08	14.73	83
CZ0002079789	0.49	0.88	0.24	0.32	0.56	2.32	2.97	2.57	3.12	150.95	16.88	88
CZ0002080269	0.53	0.85	0.25	0.33	0.62	2.32	4.20	4.00	3.12	113.47	12.57	81
CZ0002080279	0.42	0.96	0.26	0.34	0.59	3.49	1.94	2.25	3.12	146.78	15.86	69
CZ0002080379	0.48	0.75	0.21	0.27	0.47	5.23	3.87	3.82	6.25	179.05	18.99	87
CZ0002200429	0.64	1.10	0.30	0.42	0.77	2.32	1.95	2.11	2.08	123.88	10.46	73
CZ0002200449	0.92	1.14	0.36	0.53	1.14	3.49	1.99	2.70	9.39	155.23	17.22	70
CZ0002235659	0.43	0.97	0.25	0.32	0.55	2.90	3.05	3.26	4.16	174.89	20.50	82
CZ0002235649	0.63	1.06	0.27	0.36	0.62	1.74	3.22	2.98	4.16	214.45	18.65	68
CZ0002235669	0.70	1.07	0.29	0.40	0.73	2.90	2.11	2.61	5.20	208.20	15.92	9
CZ0002235719	0.64	1.14	0.31	0.43	0.77	1.74	2.14	2.63	3.12	121.89	12.25	70
CZ0002235789	0.62	1.21	0.30	0.41	0.69	2.32	1.61	2.78	3.12	170.72	14.27	84
CZ0002235939	0.69	1.20	0.29	0.40	0.68	2.90	7.12	6.44	4.16	208.29	19.81	67
CZ0002235999	0.60	1.02	0.28	0.37	0.66	3.49	2.19	2.35	3.12	143.66	12.74	95
CZ0002236109	1.00	1.27	0.35	0.53	1.00	6.39	5.43	6.15	6.25	191.54	13.80	14
CZ0002236199	0.70	1.01	0.28	0.38	0.70	3.49	3.04	2.16	5.20	220.89	14.50	9
CZ0002236559	0.75	1.02	0.29	0.40	0.77	4.07	2.30	2.65	5.20	155.11	18.53	58
CZ0002236669	0.80	1.31	0.32	0.48	0.79	4.07	5.32	6.17	5.20	226.94	20.51	18
CZ0002236989	0.42	0.81	0.22	0.28	0.49	3.49	8.30	6.45	4.16	165.52	17.87	46
CZ0002356039	0.88	1.52	0.34	0.49	0.82	5.23	3.50	4.09	4.16	222.77	15.23	46
CZ0002356119	0.84	1.22	0.30	0.41	0.70	4.85	3.85	3.28	2.08	214.45	13.10	26
CZ0002356549	0.56	1.03	0.26	0.34	0.58	4.85	6.89	4.77	4.16	190.50	19.10	44
CZ0002356899	0.64	0.88	0.26	0.35	0.66	4.85	5.01	4.10	6.25	172.81	17.32	80
CZ0002358769	0.55	1.08	0.29	0.39	0.68	2.90	5.25	4.68	2.08	147.82	13.59	17
CZ0002358779	0.88	1.46	0.36	0.54	0.96	5.23	4.37	5.95	3.12	189.48	12.09	10
CZ0002358799	0.42	0.97	0.25	0.33	0.57	1.74	1.72	2.33	1.04	130.13	14.08	77
CZ0002429899	0.52	0.91	0.25	0.33	0.57	2.32	3.11	2.69	3.12	147.82	16.94	94
CZ0002429929	0.80	1.27	0.32	0.45	0.77	5.81	6.80	6.26	3.12	189.46	12.66	14
CZ0002429949	0.70	1.19	0.30	0.42	0.74	4.85	2.62	3.43	5.20	202.98	17.99	85
CZ0002429969	1.52	2.96	0.42	0.59	1.17	11.62	18.34	19.95	10.41	362.48	28.04	69
CZ0002429999	0.53	1.04	0.27	0.37	0.64	4.07	2.95	3.37	4.16	164.45	14.80	72

Ketosis Detection - Farm Feedback

- 0 % of False Negative Animals Identified
- less than 1 % of False Positive Animals Identified
- 100 % of True Positive Animals Identified

Unique solution done by Bentley Instruments

Ketosis Detection - Probabilistic Approach

Main Goals

- usage of milk recording samples & automated SW solution
 - overview of herd situation in time, monthly based report, animal recording data, no additional sampling&costs, to give a new tool for farm management
- to combine different group of parameters to increase probability of detection
 - animal recording data, ketosis related results, milk components ratios
- minor milk components calibrations related to ketosis
 - Aceton, BHB, BBHB, OA, CA, sampling frequency related calibrations

Unique solution done by Bentley Instruments



Ketosis Detection

A New Probabilistic Approach

Thank you for your attention!!



Ketosis Farm& Individual Cow Report

27. 04. 2015

Farm ID: 810165935

Selected month for detailed report:

4-2015

Time Period
2-2013
3-2013
4-2013
5-2013
6-2013
7-2013
8-2013
9-2013
10-2013
11-2013
12-2013
1-2014
2-2014
3-2015
4-2015

Summary Table - Lactacion group < 100 days - time period

Month	Mean Values												
	Count	Milk Yield (l)	OA %	F/P	F/S	F/SNF	F/L	Ac1 (mg/l)	Ac2 (mg/l)	Ac3 (mg/l)	BHBA (mg/l)	BHBB (mg/l)	BHBGC (mg/kg)
3-2013	118	32.88	0.88	1.29	0.31	0.48	0.85	3.71	6.00	4.79	4.46	203.82	13.19
4-2013	102	32.96	0.74	1.16	0.28	0.42	0.74	2.81	5.26	3.82	3.44	184.45	13.99
5-2013	105	30.25	0.91	1.28	0.31	0.47	0.84	3.86	4.54	4.45	4.61	211.77	14.02
6-2013	84	31.06	0.88	1.25	0.30	0.46	0.82	4.27	9.90	8.61	4.15	230.88	15.92
7-2013	99	34.00	0.77	1.15	0.29	0.43	0.76	4.78	13.73	13.15	3.56	203.62	17.20
8-2013	128	30.98	0.84	1.28	0.31	0.47	0.84	4.75	10.97	11.57	4.09	204.89	15.02
9-2013	13	33.92	0.83	1.31	0.36	0.50	0.91	4.47	5.86	6.15	4.48	202.43	18.01
10-2013	7	37.36	0.81	1.24	0.34	0.47	0.84	4.23	7.76	6.42	3.72	194.37	17.80
11-2013	126	34.89	0.71	1.15	0.33	0.45	0.82	4.50	6.60	5.96	3.80	158.41	18.03
12-2013	119	34.93	0.72	1.17	0.30	0.45	0.83	4.11	3.16	2.17	3.58	139.81	12.00
1-2014	109	34.67	0.72	1.20	0.34	0.47	0.86	3.86	5.70	6.01	3.95	170.25	17.60
2-2014	96	32.55	0.86	1.25	0.32	0.48	0.87	4.68	4.22	5.67	4.71	186.18	12.90
3-2015	104	33.17	0.66	1.04	0.29	0.40	0.73	3.47	4.93	5.22	4.14	161.58	14.17
4-2015	96	35.31	0.70	1.13	0.30	0.42	0.74	3.36	4.88	5.30	3.64	170.52	14.71
Totals/Avg	1306	33.49	0.79	1.21	0.31	0.45	0.82	4.06	6.68	6.38	4.02	187.35	15.32

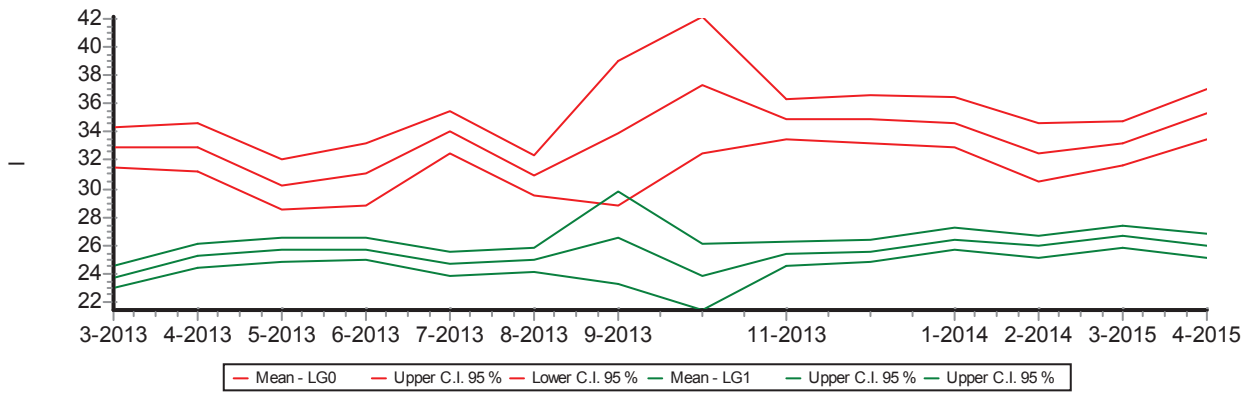
Summary Table - Lactacion group > 100 days - time period

MESIC	Mean Values												
	Count	Milk Yield (l)	OA %	F/P	F/S	F/SNF	F/L	Ac1 (mg/l)	Ac2 (mg/l)	Ac3 (mg/l)	BHBA (mg/l)	BHBB (mg/l)	BHBGC (mg/kg)
3-2013	311	23.74	0.81	1.19	0.31	0.47	0.87	2.99	5.93	4.44	4.79	184.21	11.92
4-2013	304	25.22	0.71	1.11	0.29	0.43	0.80	1.57	3.08	2.51	3.36	165.23	11.79
5-2013	304	25.66	0.78	1.13	0.29	0.44	0.81	2.39	2.56	2.39	4.11	182.59	11.13
6-2013	317	25.70	0.75	1.12	0.29	0.43	0.79	3.31	7.12	5.82	4.01	204.35	14.61
7-2013	294	24.69	0.74	1.06	0.29	0.42	0.78	3.81	8.67	7.67	3.90	198.42	14.50
8-2013	285	24.94	0.78	1.13	0.30	0.45	0.85	3.21	6.84	6.84	4.21	190.00	12.83
9-2013	32	26.52	0.69	1.14	0.34	0.46	0.88	1.94	4.21	3.58	3.32	162.27	15.39
10-2013	24	23.76	0.68	1.14	0.34	0.47	0.90	1.65	3.23	2.69	3.25	152.38	15.04
11-2013	303	25.40	0.74	1.12	0.34	0.46	0.89	3.51	6.52	5.54	4.33	158.60	16.87
12-2013	305	25.56	0.72	1.11	0.30	0.46	0.89	3.00	2.78	1.87	4.19	135.00	10.90
1-2014	325	26.44	0.72	1.14	0.35	0.47	0.90	2.56	4.62	4.71	3.96	160.25	15.69
2-2014	347	25.89	0.79	1.13	0.31	0.46	0.87	3.51	3.00	3.76	4.73	174.70	11.02
3-2015	357	26.60	0.66	1.07	0.30	0.42	0.79	2.07	3.82	3.59	3.95	159.72	12.80
4-2015	365	25.95	0.69	1.11	0.31	0.44	0.82	2.11	3.44	3.49	4.00	160.95	13.35
Totals/Avg	3873	25.43	0.73	1.12	0.31	0.45	0.84	2.69	4.70	4.21	4.01	170.62	13.42

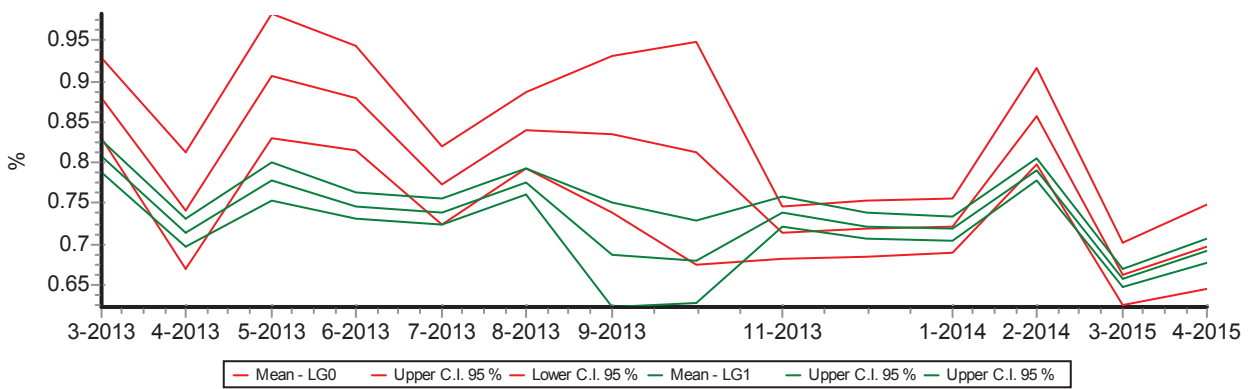
Farm ID: 810165935
Selected month: 4-2015

Time report on milk indicators & keton bodies results

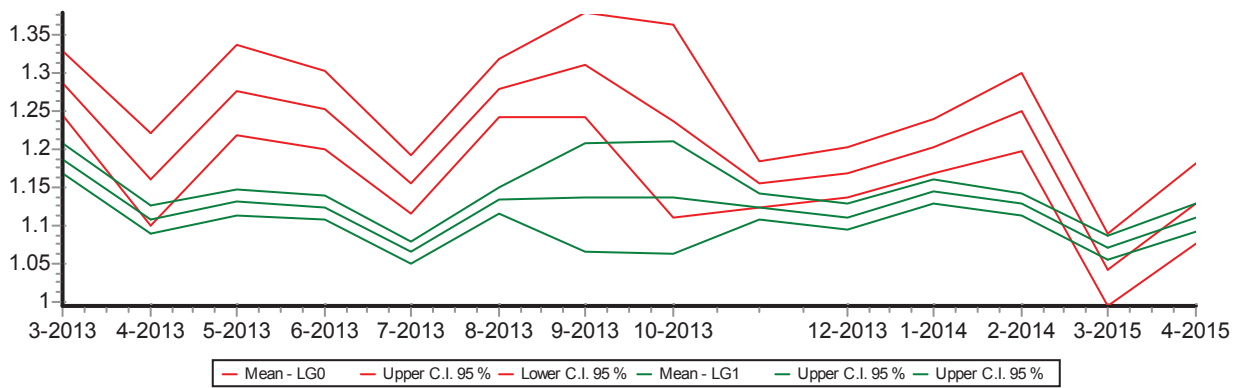
Milk Yield



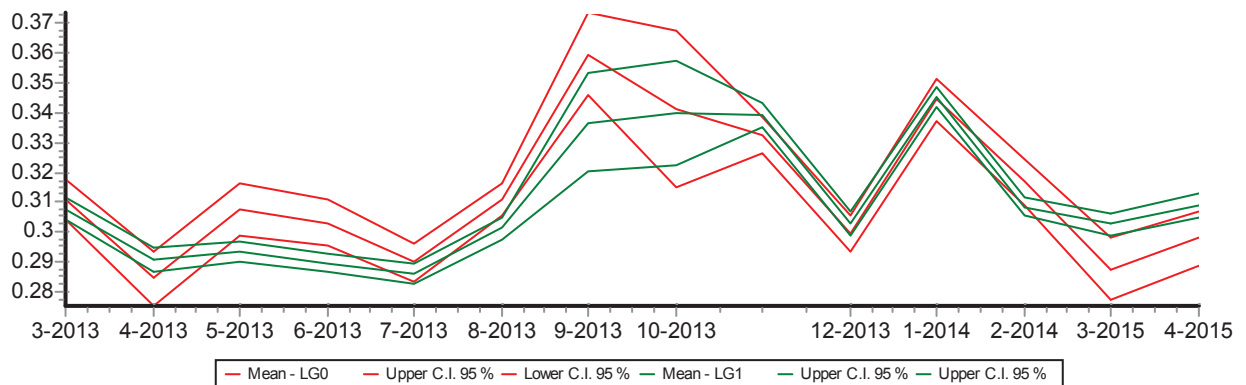
Oleic Acid



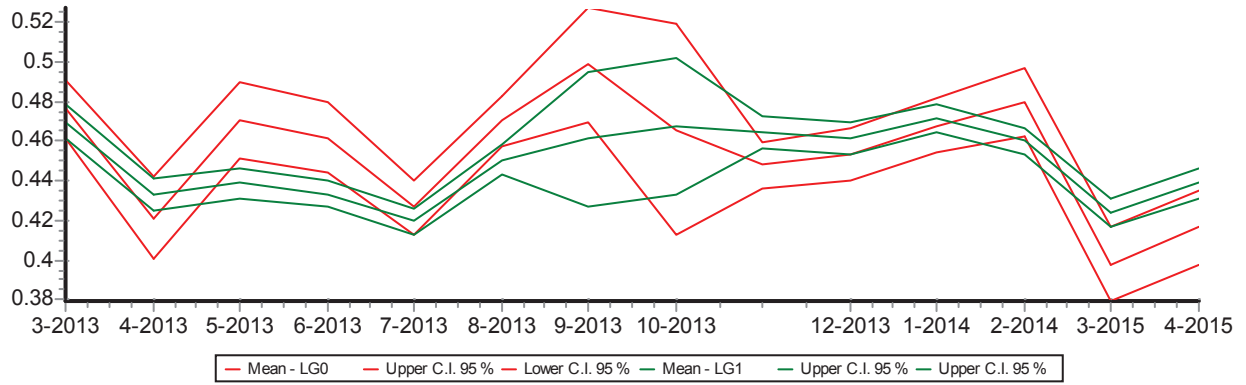
Fat/Protein



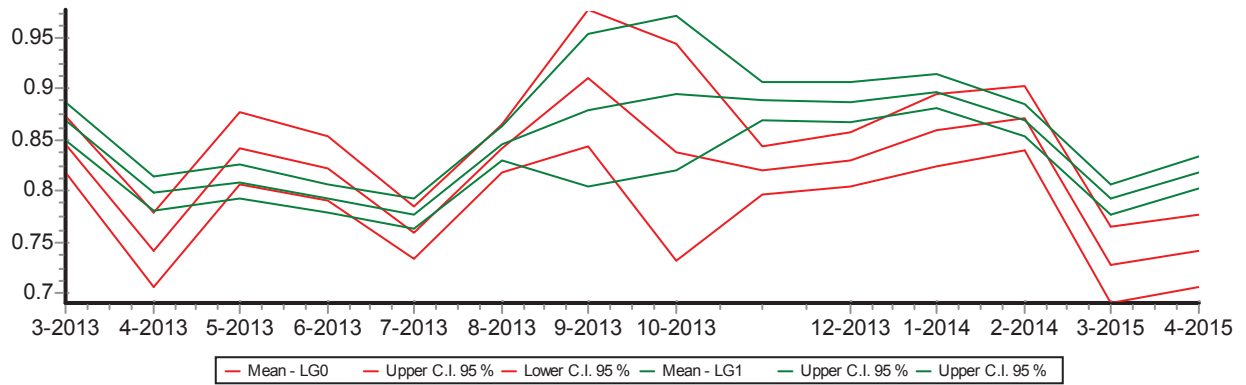
Fat/Solids



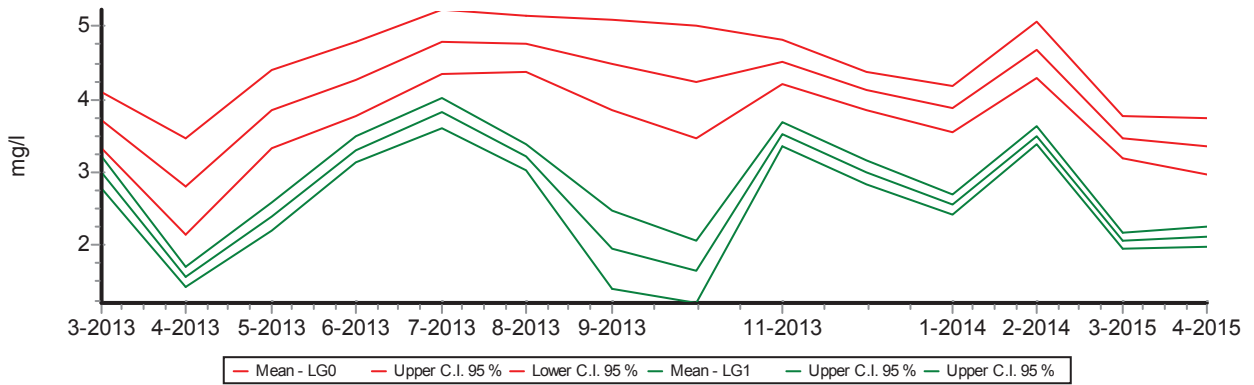
Fat/SNF



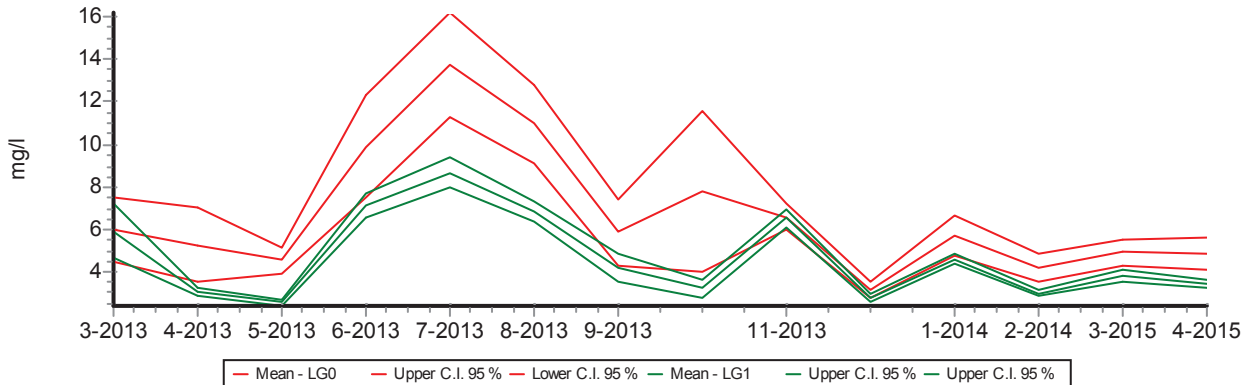
Fat/Lactose



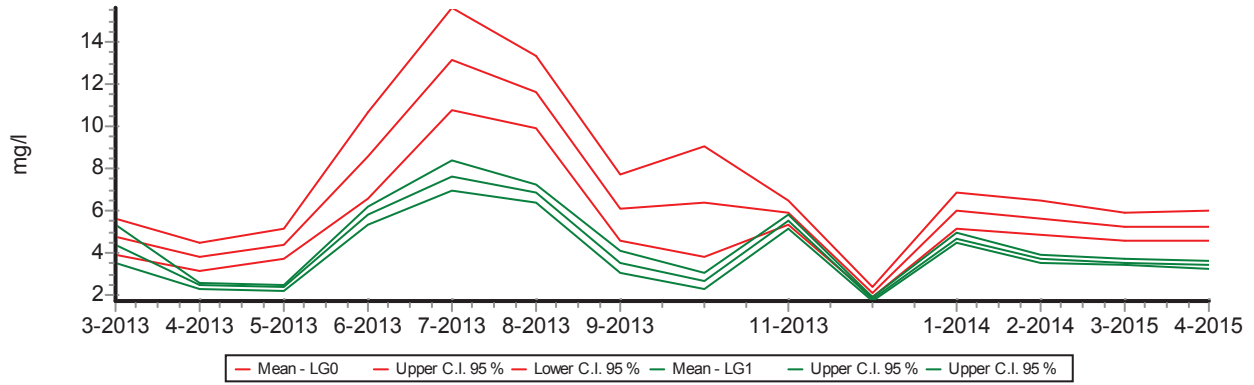
Acetone1



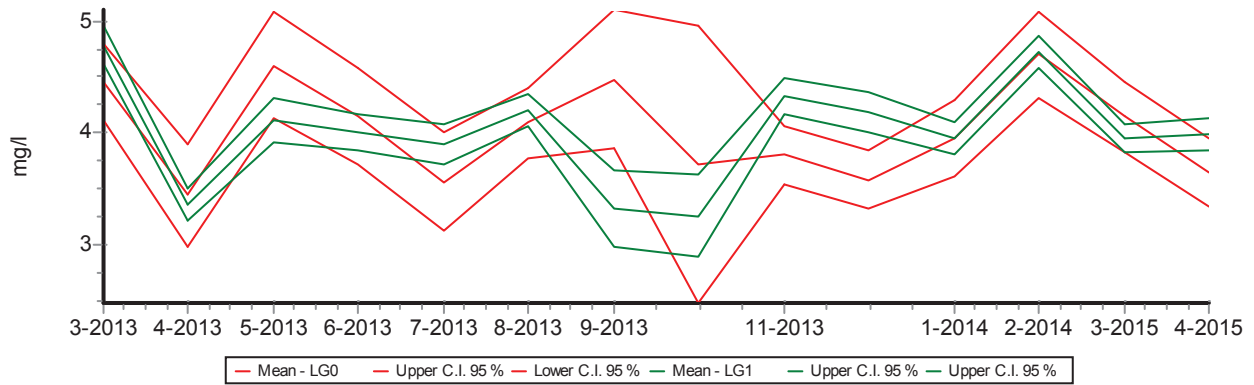
Acetone2



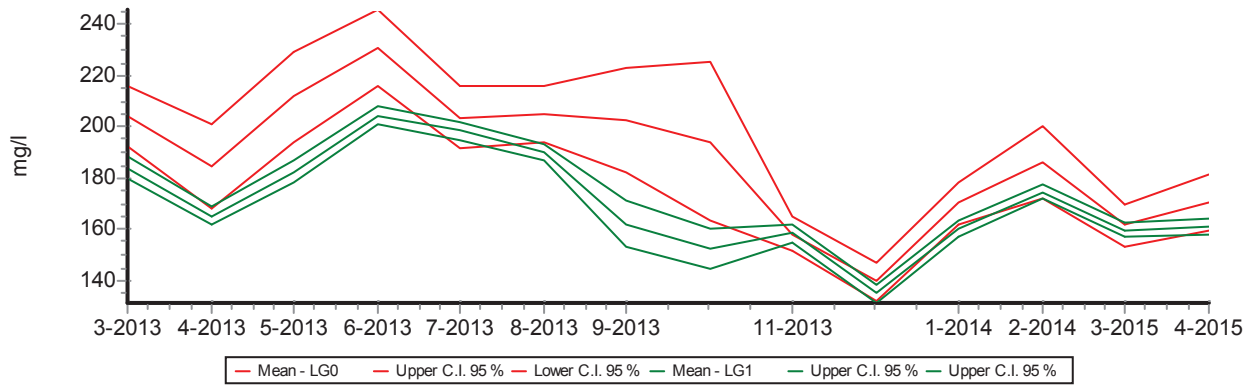
Acetone3



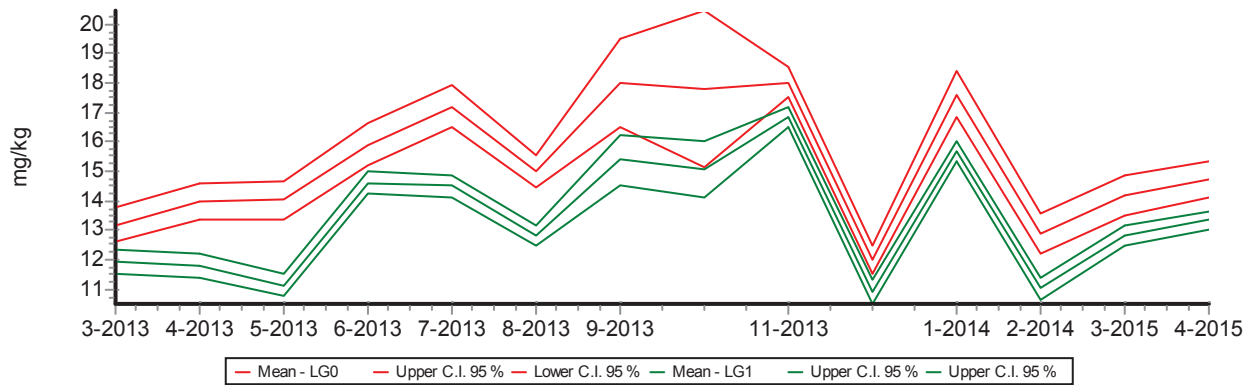
BHBA



BHBB

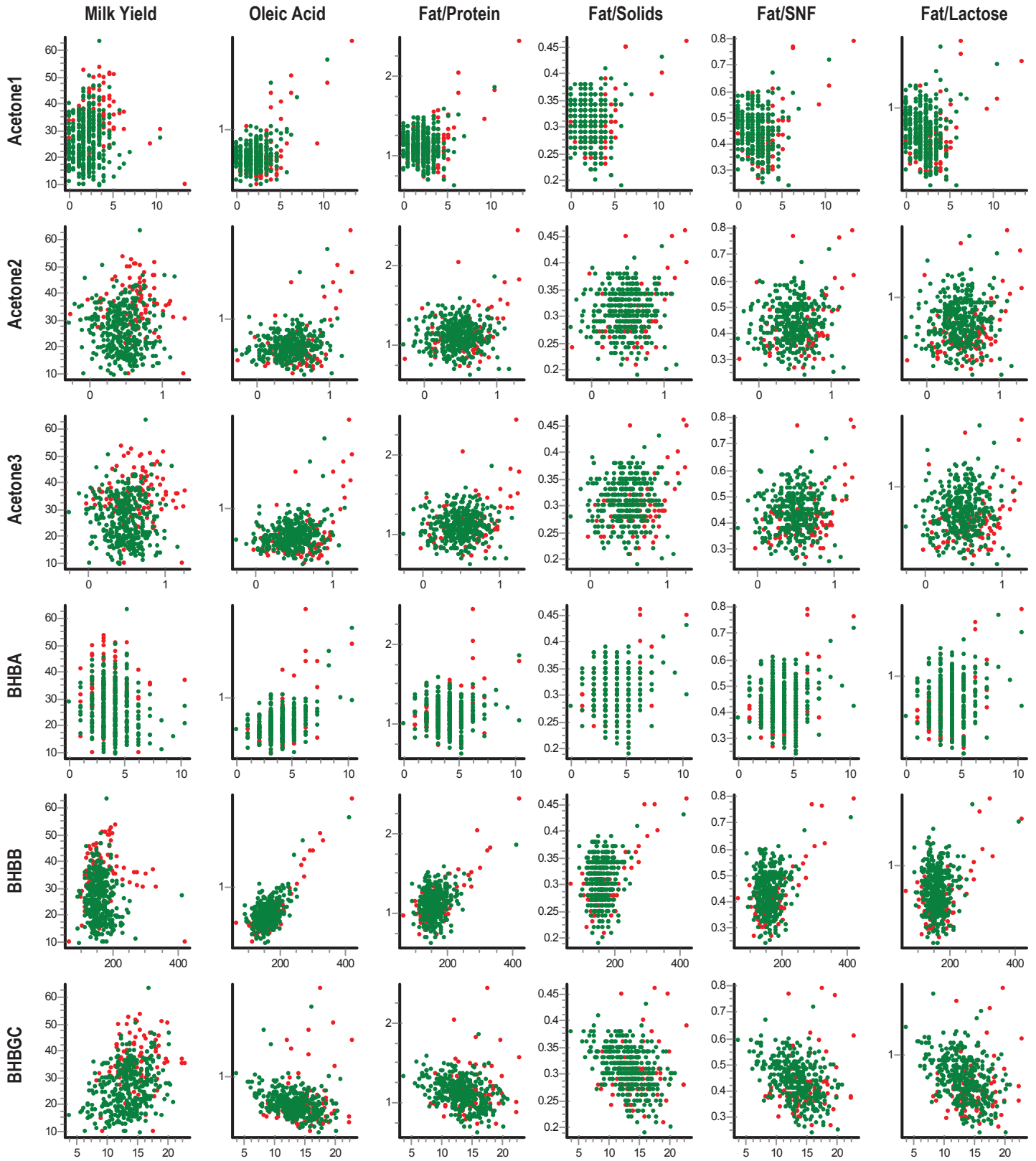


BHBGC



Milk indicators and keton bodies results for individual cows grouped by 100th lactation day

Month 4-2015



Individual cow (lactation day<100) report based on dataset limits.

Result under 75 % quantile

Result under 95 % quantile

Result above 95 % quantile

ID												
	OA	F/P	F/S	F/SNF	F/L	Ac1	Ac2	Ac3	BHBA	BHBB	BHBGC	Lact. Day
CZ0001377459	1.11	1.32	0.34	0.49	0.89	5.23	13.04	14.51	7.29	274.82	20.09	12
CZ0001780879	0.79	1.45	0.38	0.59	1.15	1.74	0.95	1.17	3.12	137.41	17.01	77
CZ0001912489	0.72	0.98	0.28	0.37	0.67	1.74	3.75	3.74	3.12	192.59	13.49	30
CZ0001912999	0.66	1.13	0.30	0.41	0.73	0.00	1.88	1.22	2.08	168.64	12.74	78
CZ0001913939	0.68	0.95	0.27	0.35	0.63	3.49	3.29	3.27	4.16	163.44	14.82	51
CZ0002030729	0.79	1.06	0.28	0.37	0.65	3.49	2.88	2.77	3.12	209.24	15.54	33
CZ0002030949	0.70	1.10	0.31	0.44	0.83	3.49	2.08	2.08	3.12	148.86	14.85	93
CZ0002031209	0.85	1.26	0.32	0.45	0.79	4.07	3.64	4.82	3.12	190.50	13.33	27
CZ0002077199	1.39	1.56	0.39	0.61	1.11	4.07	11.59	10.46	7.29	301.89	22.83	10
CZ0002077219	0.61	1.10	0.28	0.38	0.66	3.49	5.01	4.97	4.16	200.91	20.03	38
CZ0002077619	0.70	1.26	0.33	0.49	0.89	5.23	4.68	5.78	6.25	164.48	18.18	46
CZ0002079139	0.62	1.06	0.28	0.38	0.66	2.90	3.36	2.95	2.08	186.34	11.90	56
CZ0002079239	0.62	1.13	0.29	0.40	0.69	2.90	4.01	3.39	2.08	164.48	11.50	89
CZ0002079389	0.45	0.77	0.23	0.30	0.54	4.07	6.08	6.84	4.16	130.13	13.96	91
CZ0002079539	0.60	1.09	0.30	0.41	0.74	2.32	1.71	2.02	1.04	104.10	16.48	40
CZ0002079649	0.55	0.93	0.27	0.36	0.67	2.32	5.88	5.22	3.12	134.29	16.46	49
CZ0002079719	0.60	1.09	0.28	0.39	0.67	1.74	9.26	7.42	3.12	173.85	12.48	99
CZ0002080269	1.57	1.79	0.45	0.76	1.48	6.39	13.23	18.07	10.41	324.79	19.78	52
CZ0002080279	0.52	1.09	0.29	0.40	0.69	3.49	7.80	7.05	3.12	163.44	17.05	40
CZ0002080379	0.49	0.72	0.21	0.27	0.47	4.65	4.24	3.44	5.20	166.56	19.13	58
CZ0002200349	0.57	0.94	0.28	0.38	0.70	5.23	5.32	5.34	5.20	133.25	16.55	83
CZ0002200429	0.59	0.96	0.28	0.38	0.72	2.32	5.65	6.18	3.12	119.71	10.63	44
CZ0002200449	0.55	0.87	0.28	0.38	0.77	4.07	6.35	6.23	7.29	119.71	22.42	41
CZ0002235639	0.68	1.03	0.31	0.43	0.84	4.65	2.58	2.92	4.16	113.47	14.51	92
CZ0002235649	0.78	1.14	0.30	0.41	0.73	1.74	4.41	4.35	4.16	191.54	15.51	39
CZ0002235719	1.24	2.18	0.61	0.86	1.58	4.07	6.78	8.02	8.33	282.11	28.81	82
CZ0002235749	0.51	0.94	0.27	0.36	0.64	1.16	3.96	3.68	4.16	141.58	13.14	88
CZ0002235939	0.47	0.84	0.24	0.30	0.53	2.90	8.11	7.25	2.08	148.86	13.77	38
CZ0002235999	1.17	2.12	0.56	0.77	1.34	5.23	8.68	7.85	6.25	315.42	28.17	132
CZ0002236559	0.73	1.09	0.31	0.43	0.80	2.32	4.69	5.20	4.16	163.44	18.43	29
CZ0002236989	0.73	1.05	0.29	0.39	0.69	4.65	8.09	9.35	3.12	190.50	14.64	17
CZ0002238599	0.57	0.98	0.28	0.38	0.69	3.49	2.18	2.16	1.04	106.18	8.27	76
CZ0002238769	0.60	0.96	0.30	0.41	0.81	1.74	3.46	3.01	2.08	65.58	9.24	85
CZ0002358039	1.49	1.83	0.40	0.62	1.06	10.46	21.27	13.75	6.25	334.16	15.63	17
CZ0002358549	0.84	1.35	0.34	0.49	0.85	5.81	8.19	10.36	3.12	198.83	15.92	15
CZ0002358559	0.60	0.98	0.27	0.36	0.64	1.16	5.24	6.71	3.12	144.70	15.62	75
CZ0002358699	0.84	1.45	0.36	0.55	0.99	9.30	7.85	7.12	6.25	192.59	18.27	51
CZ0002429899	0.39	0.72	0.22	0.27	0.49	2.32	3.22	4.39	3.12	114.51	15.96	65
CZ0002429949	0.49	1.00	0.28	0.37	0.66	2.32	4.94	5.25	5.20	165.52	22.33	56
CZ0002429969	1.95	2.45	0.46	0.79	1.33	13.36	20.61	16.42	6.25	421.61	17.51	40
CZ0002429999	0.46	0.91	0.25	0.33	0.57	2.90	3.70	3.93	4.16	127.00	16.29	43
CZ0002430019	0.60	1.32	0.32	0.45	0.77	4.07	4.44	3.77	3.12	157.19	11.57	41
CZ0002430049	0.69	1.16	0.31	0.43	0.77	4.07	5.26	9.34	4.16	163.44	15.63	15
CZ0002430089	0.64	1.09	0.31	0.44	0.83	2.90	6.00	9.54	5.20	155.11	18.22	26
CZ0002430189	0.48	1.08	0.30	0.43	0.79	2.90	6.13	6.90	4.16	115.55	17.78	26
CZ0002430449	0.47	0.98	0.27	0.35	0.62	2.32	5.08	5.62	4.16	149.90	18.11	40
CZ0002430509	0.76	1.22	0.31	0.43	0.74	5.23	4.46	6.49	4.16	178.01	14.98	13
CZ0002430589	0.72	1.17	0.29	0.39	0.65	4.65	8.00	7.87	4.16	211.32	18.54	39

Result under 75 % quantile

Result under 95 % quantile

Result above 95 % quantile

ID												
	OA	F/P	F/S	F/SNF	F/L	Ac1	Ac2	Ac3	BHBA	BHBB	BHBGC	Lact. Day
CZ0002430629	0.56	1.05	0.29	0.39	0.70	4.65	7.14	8.57	3.12	140.54	13.43	24
CZ0002430709	0.52	1.07	0.28	0.38	0.66	2.90	2.25	2.42	2.08	139.49	12.22	75
CZ0002430879	0.55	0.89	0.24	0.31	0.53	2.32	5.08	5.29	4.16	189.46	18.44	41
CZ0002430899	0.49	0.84	0.24	0.31	0.54	3.49	4.06	3.75	3.12	133.25	13.09	69
CZ0002430969	0.70	0.97	0.28	0.39	0.72	2.32	3.56	2.97	3.12	157.19	8.95	72
CZ0002431029	1.29	1.52	0.37	0.57	1.02	5.23	14.95	17.34	4.16	272.74	12.93	8
CZ0002431159	0.55	0.84	0.24	0.31	0.56	4.07	1.45	1.58	3.12	150.95	12.78	94
CZ0002431209	0.60	1.14	0.32	0.46	0.87	2.32	4.83	5.90	2.08	100.98	13.59	15
CZ0002431229	0.50	0.93	0.26	0.35	0.63	2.32	4.92	5.14	4.16	147.82	18.11	31
CZ0002431679	0.73	1.26	0.34	0.49	0.91	4.65	2.94	3.88	3.12	123.88	14.57	8
CZ0002432129	0.60	0.95	0.27	0.36	0.65	2.32	4.08	3.33	3.12	147.82	12.16	22
CZ0002432639	0.56	0.97	0.27	0.37	0.66	0.58	1.21	1.27	1.04	122.84	8.82	79
CZ0002432779	1.03	1.34	0.33	0.46	0.79	1.16	1.81	1.91	4.16	250.88	14.03	43
CZ0002432869	0.63	1.22	0.31	0.44	0.76	0.00	1.32	1.57	2.08	158.23	12.15	98
CZ0002433049	0.50	0.88	0.24	0.32	0.55	1.74	1.42	1.42	3.12	138.45	13.61	78
CZ0002433269	0.50	1.01	0.26	0.35	0.60	1.16	1.45	2.04	2.08	142.62	15.55	40
CZ0002433409	0.63	1.15	0.31	0.43	0.77	1.74	1.34	1.71	5.20	162.40	15.58	94
CZ0002433449	0.54	0.82	0.24	0.30	0.54	1.74	0.55	0.97	3.12	140.54	10.39	97
CZ0002433649	0.48	0.94	0.27	0.35	0.63	2.32	1.33	1.52	2.08	117.63	13.72	96
CZ0002433759	0.68	1.06	0.28	0.38	0.67	3.49	1.70	1.96	3.12	170.72	12.78	36
CZ0002433789	0.52	0.95	0.26	0.34	0.59	0.58	1.79	1.80	3.12	153.03	13.63	80
CZ0002564149	0.69	1.20	0.31	0.43	0.75	4.65	3.10	4.55	3.12	155.11	15.30	26
CZ0002564279	0.68	1.12	0.30	0.41	0.72	1.74	2.43	3.76	2.08	157.19	13.06	38
CZ0002564329	0.91	1.55	0.36	0.53	0.90	3.49	5.10	4.96	4.16	233.18	12.42	43
CZ0002564349	1.39	2.05	0.45	0.77	1.39	6.39	2.97	3.43	6.25	290.44	12.10	56
CZ0002564369	0.50	1.04	0.27	0.36	0.62	2.90	2.92	3.38	2.08	137.41	13.29	32
CZ0002564699	0.66	1.07	0.29	0.40	0.72	3.49	6.74	9.16	6.25	195.71	16.51	76
CZ0002564729	0.64	1.04	0.26	0.35	0.59	4.07	5.77	7.84	4.16	193.63	15.39	41
CZ0002564739	0.80	1.49	0.34	0.49	0.82	3.49	5.69	5.34	2.08	206.12	14.84	40
CZ0002564839	0.58	0.97	0.25	0.33	0.56	3.49	4.38	6.10	5.20	202.99	19.47	40
CZ0002564849	1.22	1.47	0.36	0.54	0.95	4.07	8.62	14.21	5.20	264.41	15.73	13
CZ0002564939	0.66	1.06	0.28	0.38	0.66	2.90	2.18	3.38	2.08	149.90	12.23	35
CZ0002564949	0.64	1.04	0.27	0.35	0.60	4.07	1.62	2.36	2.08	180.09	12.18	35
CZ0002564959	0.66	0.98	0.27	0.37	0.65	3.49	3.63	4.76	3.12	139.49	15.42	18
CZ0002564989	0.72	1.37	0.34	0.49	0.86	1.74	1.46	2.08	2.08	161.35	9.03	54
CZ0002565029	1.04	1.88	0.53	0.70	1.24	6.39	4.11	4.56	5.20	271.70	25.69	134
CZ0002565039	0.76	1.21	0.31	0.43	0.74	2.32	6.22	5.97	2.08	187.38	11.54	39
CZ0002565089	0.76	1.19	0.30	0.42	0.72	2.90	5.30	6.14	4.16	213.40	18.64	21
CZ0002565099	0.51	1.08	0.29	0.39	0.68	4.65	3.03	4.12	4.16	157.19	15.73	29
CZ0002565209	0.70	1.16	0.30	0.41	0.70	4.07	3.71	4.28	3.12	170.72	13.68	29
CZ0002565239	0.64	1.21	0.29	0.39	0.65	4.65	4.37	4.55	3.12	171.76	12.23	33
CZ0002565249	0.97	1.32	0.33	0.48	0.83	3.49	10.85	12.79	4.16	232.14	12.66	12
CZ0002565309	0.64	1.15	0.30	0.42	0.74	1.74	3.92	4.89	1.04	120.76	11.72	22
CZ0002565369	0.68	1.19	0.32	0.45	0.81	3.49	2.51	3.44	2.08	125.96	11.79	16
CZ0002565439	0.71	1.17	0.31	0.43	0.75	3.49	5.26	6.01	3.12	168.64	13.31	18

Individual cow (lactation day<100) report based on actual month computed limits.

Result under 50 % quantile

Result under 75 % quantile

Result under 95 % quantile

Result above 95 % quantile

ID												
	OA	F/P	F/S	F/SNF	F/L	Ac1	Ac2	Ac3	BHBA	BHBB	BHBGC	Lact. Day
CZ0001377459	1.11	1.32	0.34	0.49	0.89	5.23	13.04	14.51	7.29	274.82	20.09	12
CZ0001780879	0.79	1.45	0.38	0.59	1.15	1.74	0.95	1.17	3.12	137.41	17.01	77
CZ0001912489	0.72	0.98	0.28	0.37	0.67	1.74	3.75	3.74	3.12	192.59	13.49	30
CZ0001912999	0.66	1.13	0.30	0.41	0.73	0.00	1.88	1.22	2.08	168.64	12.74	78
CZ0001913939	0.68	0.95	0.27	0.35	0.63	3.49	3.29	3.27	4.16	163.44	14.82	51
CZ0002030729	0.79	1.06	0.28	0.37	0.65	3.49	2.88	2.77	3.12	209.24	15.54	33
CZ0002030949	0.70	1.10	0.31	0.44	0.83	3.49	2.08	2.08	3.12	148.86	14.85	93
CZ0002031209	0.85	1.26	0.32	0.45	0.79	4.07	3.64	4.82	3.12	190.50	13.33	27
CZ0002077199	1.39	1.56	0.39	0.61	1.11	4.07	11.59	10.46	7.29	301.89	22.83	10
CZ0002077219	0.61	1.10	0.28	0.38	0.66	3.49	5.01	4.97	4.16	200.91	20.03	38
CZ0002077619	0.70	1.26	0.33	0.49	0.89	5.23	4.68	5.78	6.25	164.48	18.18	46
CZ0002079139	0.62	1.06	0.28	0.38	0.66	2.90	3.36	2.95	2.08	186.34	11.90	56
CZ0002079239	0.62	1.13	0.29	0.40	0.69	2.90	4.01	3.39	2.08	164.48	11.50	89
CZ0002079389	0.45	0.77	0.23	0.30	0.54	4.07	6.08	6.84	4.16	130.13	13.96	91
CZ0002079539	0.60	1.09	0.30	0.41	0.74	2.32	1.71	2.02	1.04	104.10	16.48	40
CZ0002079649	0.55	0.93	0.27	0.36	0.67	2.32	5.88	5.22	3.12	134.29	16.46	49
CZ0002079719	0.60	1.09	0.28	0.39	0.67	1.74	9.26	7.42	3.12	173.85	12.48	99
CZ0002080269	1.57	1.79	0.45	0.76	1.48	6.39	13.23	18.07	10.41	324.79	19.78	52
CZ0002080279	0.52	1.09	0.29	0.40	0.69	3.49	7.80	7.05	3.12	163.44	17.05	40
CZ0002080379	0.49	0.72	0.21	0.27	0.47	4.65	4.24	3.44	5.20	166.56	19.13	58
CZ0002200349	0.57	0.94	0.28	0.38	0.70	5.23	5.32	5.34	5.20	133.25	16.55	83
CZ0002200429	0.59	0.96	0.28	0.38	0.72	2.32	5.65	6.18	3.12	119.71	10.63	44
CZ0002200449	0.55	0.87	0.28	0.38	0.77	4.07	6.35	6.23	7.29	119.71	22.42	41
CZ0002235639	0.68	1.03	0.31	0.43	0.84	4.65	2.58	2.92	4.16	113.47	14.51	92
CZ0002235649	0.78	1.14	0.30	0.41	0.73	1.74	4.41	4.35	4.16	191.54	15.51	39
CZ0002235719	1.24	2.18	0.61	0.86	1.58	4.07	6.78	8.02	8.33	282.11	28.81	82
CZ0002235749	0.51	0.94	0.27	0.36	0.64	1.16	3.96	3.68	4.16	141.58	13.14	88
CZ0002235939	0.47	0.84	0.24	0.30	0.53	2.90	8.11	7.25	2.08	148.86	13.77	38
CZ0002235999	1.17	2.12	0.56	0.77	1.34	5.23	8.68	7.85	6.25	315.42	28.17	132
CZ0002236559	0.73	1.09	0.31	0.43	0.80	2.32	4.69	5.20	4.16	163.44	18.43	29
CZ0002236989	0.73	1.05	0.29	0.39	0.69	4.65	8.09	9.35	3.12	190.50	14.64	17
CZ0002238599	0.57	0.98	0.28	0.38	0.69	3.49	2.18	2.16	1.04	106.18	8.27	76
CZ0002238769	0.60	0.96	0.30	0.41	0.81	1.74	3.46	3.01	2.08	65.58	9.24	85
CZ0002358039	1.49	1.83	0.40	0.62	1.06	10.46	21.27	13.75	6.25	334.16	15.63	17
CZ0002358549	0.84	1.35	0.34	0.49	0.85	5.81	8.19	10.36	3.12	198.83	15.92	15
CZ0002358559	0.60	0.98	0.27	0.36	0.64	1.16	5.24	6.71	3.12	144.70	15.62	75
CZ0002358699	0.84	1.45	0.36	0.55	0.99	9.30	7.85	7.12	6.25	192.59	18.27	51
CZ0002429899	0.39	0.72	0.22	0.27	0.49	2.32	3.22	4.39	3.12	114.51	15.96	65
CZ0002429949	0.49	1.00	0.28	0.37	0.66	2.32	4.94	5.25	5.20	165.52	22.33	56
CZ0002429969	1.95	2.45	0.46	0.79	1.33	13.36	20.61	16.42	6.25	421.61	17.51	40
CZ0002429999	0.46	0.91	0.25	0.33	0.57	2.90	3.70	3.93	4.16	127.00	16.29	43
CZ0002430019	0.60	1.32	0.32	0.45	0.77	4.07	4.44	3.77	3.12	157.19	11.57	41
CZ0002430049	0.69	1.16	0.31	0.43	0.77	4.07	5.26	9.34	4.16	163.44	15.63	15
CZ0002430089	0.64	1.09	0.31	0.44	0.83	2.90	6.00	9.54	5.20	155.11	18.22	26
CZ0002430189	0.48	1.08	0.30	0.43	0.79	2.90	6.13	6.90	4.16	115.55	17.78	26
CZ0002430449	0.47	0.98	0.27	0.35	0.62	2.32	5.08	5.62	4.16	149.90	18.11	40
CZ0002430509	0.76	1.22	0.31	0.43	0.74	5.23	4.46	6.49	4.16	178.01	14.98	13
CZ0002430589	0.72	1.17	0.29	0.39	0.65	4.65	8.00	7.87	4.16	211.32	18.54	39

Result under 50 % quantile

Result under 75 % quantile

Result under 95 % quantile

Result above 95 % quantile

ID												
	OA	F/P	F/S	F/SNF	F/L	Ac1	Ac2	Ac3	BHBA	BHBB	BHBGC	Lact. Day
CZ0002430629	0.56	1.05	0.29	0.39	0.70	4.65	7.14	8.57	3.12	140.54	13.43	24
CZ0002430709	0.52	1.07	0.28	0.38	0.66	2.90	2.25	2.42	2.08	139.49	12.22	75
CZ0002430879	0.55	0.89	0.24	0.31	0.53	2.32	5.08	5.29	4.16	189.46	18.44	41
CZ0002430899	0.49	0.84	0.24	0.31	0.54	3.49	4.06	3.75	3.12	133.25	13.09	69
CZ0002430969	0.70	0.97	0.28	0.39	0.72	2.32	3.56	2.97	3.12	157.19	8.95	72
CZ0002431029	1.29	1.52	0.37	0.57	1.02	5.23	14.95	17.34	4.16	272.74	12.93	8
CZ0002431159	0.55	0.84	0.24	0.31	0.56	4.07	1.45	1.58	3.12	150.95	12.78	94
CZ0002431209	0.60	1.14	0.32	0.46	0.87	2.32	4.83	5.90	2.08	100.98	13.59	15
CZ0002431229	0.50	0.93	0.26	0.35	0.63	2.32	4.92	5.14	4.16	147.82	18.11	31
CZ0002431679	0.73	1.26	0.34	0.49	0.91	4.65	2.94	3.88	3.12	123.88	14.57	8
CZ0002432129	0.60	0.95	0.27	0.36	0.65	2.32	4.08	3.33	3.12	147.82	12.16	22
CZ0002432639	0.56	0.97	0.27	0.37	0.66	0.58	1.21	1.27	1.04	122.84	8.82	79
CZ0002432779	1.03	1.34	0.33	0.46	0.79	1.16	1.81	1.91	4.16	250.88	14.03	43
CZ0002432869	0.63	1.22	0.31	0.44	0.76	0.00	1.32	1.57	2.08	158.23	12.15	98
CZ0002433049	0.50	0.88	0.24	0.32	0.55	1.74	1.42	1.42	3.12	138.45	13.61	78
CZ0002433269	0.50	1.01	0.26	0.35	0.60	1.16	1.45	2.04	2.08	142.62	15.55	40
CZ0002433409	0.63	1.15	0.31	0.43	0.77	1.74	1.34	1.71	5.20	162.40	15.58	94
CZ0002433449	0.54	0.82	0.24	0.30	0.54	1.74	0.55	0.97	3.12	140.54	10.39	97
CZ0002433649	0.48	0.94	0.27	0.35	0.63	2.32	1.33	1.52	2.08	117.63	13.72	96
CZ0002433759	0.68	1.06	0.28	0.38	0.67	3.49	1.70	1.96	3.12	170.72	12.78	36
CZ0002433789	0.52	0.95	0.26	0.34	0.59	0.58	1.79	1.80	3.12	153.03	13.63	80
CZ0002564149	0.69	1.20	0.31	0.43	0.75	4.65	3.10	4.55	3.12	155.11	15.30	26
CZ0002564279	0.68	1.12	0.30	0.41	0.72	1.74	2.43	3.76	2.08	157.19	13.06	38
CZ0002564329	0.91	1.55	0.36	0.53	0.90	3.49	5.10	4.96	4.16	233.18	12.42	43
CZ0002564349	1.39	2.05	0.45	0.77	1.39	6.39	2.97	3.43	6.25	290.44	12.10	56
CZ0002564369	0.50	1.04	0.27	0.36	0.62	2.90	2.92	3.38	2.08	137.41	13.29	32
CZ0002564699	0.66	1.07	0.29	0.40	0.72	3.49	6.74	9.16	6.25	195.71	16.51	76
CZ0002564729	0.64	1.04	0.26	0.35	0.59	4.07	5.77	7.84	4.16	193.63	15.39	41
CZ0002564739	0.80	1.49	0.34	0.49	0.82	3.49	5.69	5.34	2.08	206.12	14.84	40
CZ0002564839	0.58	0.97	0.25	0.33	0.56	3.49	4.38	6.10	5.20	202.99	19.47	40
CZ0002564849	1.22	1.47	0.36	0.54	0.95	4.07	8.62	14.21	5.20	264.41	15.73	13
CZ0002564939	0.66	1.06	0.28	0.38	0.66	2.90	2.18	3.38	2.08	149.90	12.23	35
CZ0002564949	0.64	1.04	0.27	0.35	0.60	4.07	1.62	2.36	2.08	180.09	12.18	35
CZ0002564959	0.66	0.98	0.27	0.37	0.65	3.49	3.63	4.76	3.12	139.49	15.42	18
CZ0002564989	0.72	1.37	0.34	0.49	0.86	1.74	1.46	2.08	2.08	161.35	9.03	54
CZ0002565029	1.04	1.88	0.53	0.70	1.24	6.39	4.11	4.56	5.20	271.70	25.69	134
CZ0002565039	0.76	1.21	0.31	0.43	0.74	2.32	6.22	5.97	2.08	187.38	11.54	39
CZ0002565089	0.76	1.19	0.30	0.42	0.72	2.90	5.30	6.14	4.16	213.40	18.64	21
CZ0002565099	0.51	1.08	0.29	0.39	0.68	4.65	3.03	4.12	4.16	157.19	15.73	29
CZ0002565209	0.70	1.16	0.30	0.41	0.70	4.07	3.71	4.28	3.12	170.72	13.68	29
CZ0002565239	0.64	1.21	0.29	0.39	0.65	4.65	4.37	4.55	3.12	171.76	12.23	33
CZ0002565249	0.97	1.32	0.33	0.48	0.83	3.49	10.85	12.79	4.16	232.14	12.66	12
CZ0002565309	0.64	1.15	0.30	0.42	0.74	2.90	1.74	3.92	1.04	120.76	11.72	22
CZ0002565369	0.68	1.19	0.32	0.45	0.81	3.49	2.51	3.44	2.08	125.96	11.79	16
CZ0002565439	0.71	1.17	0.31	0.43	0.75	3.49	5.26	6.01	3.12	168.64	13.31	18

Report was created by Bentley Reporting Module © 2013
 See task more on www.bentley.cz

Tabulka možných variant interpretace ketózního stavu (subklinických ketóz a klinické ketózy) podle ukazatelů v mléce s indikací závažnosti stavu ve vazbě na možné výsledky indikace ketózy z kontroly užítkovosti (předmět a výstup této certifikované metodiky QJ1510339 RO1417 CM 34) a s náznakem směru možných řešení (Hanuš et al., 2001).

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 1 *	méně závažná subklinická ketóza 2 *	závažná subklinická ketóza 3 *	možnost klinické ketózy 4 * a 5 *
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.
---	--	---	---	---	--