

ODHAD RIZIKA NARUŠENÍ ENERGETICKÉ BILANCE DOJNIC POMOCÍ MINORITNÍCH SLOŽEK MLÉKA S VYUŽITÍM ROC ANALÝZY



ISBN: 978-80-7403-319-3



Ministerstvo zemědělství
Těšnov 65/17
110 00 Praha 1

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

č. MZE-74123/2024-13141

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Odhad rizika narušení energetické bilance dojníc pomocí minoritních složek mléka s využitím ROC analýzy**

Autoři: **Ing. Magdaléna Štolcová, Ph.D., Ing. Eva Kašná, Ph.D.,
Ing. Luděk Bartoň, Ph.D., Ing. Jan Syrůček, Ph.D.**

Název organizace: **Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.**

Místo vydání: **Praha**

Rok vydání: **2024**

ISBN: **978-80-7403-319-3**

Metodika byla vypracována: **v rámci výzkumného projektu NAZV č. QK21010038.**

Využívá projekt „Pravidla pro odvětví zemědělství, lesnictví, rybolov“? **ANO.**

Ing. Jan Vodička, Ph.D.



V Praze dne 27. 12. 2024

.....
elektronický podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Jméno a funkce zástupce odborného útvaru státní správy: v z. Ing. Jan Vodička, Ph.D.

Ing. Pavel Hakl
ředitel Odboru živočišných komodit
a ochrany zvířat MZe

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe:

v Praze dne

**Mgr. Jan
Radoš**

Digitálně podepsal
Mgr. Jan Radoš
Datum: 2025.01.10
15:10:49 +01'00'

.....
Mgr. Jan Radoš

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

ODHAD RIZIKA NARUŠENÍ ENERGETICKÉ BILANCE DOJNIC POMOCÍ MINORITNÍCH SLOŽEK MLÉKA S VYUŽITÍM ROC ANALÝZY

Autoři

Ing. Magdaléna Štolcová, Ph.D.

Ing. Eva Kašná, Ph.D.

Ing. Luděk Bartoň, Ph.D.

Ing. Jan Syrůček, Ph.D.

Oponenti

Ing. Vojtěch Zink, Ph.D.

FARMCZSYSTEM, s. r. o.

Ing. Jan Vodička, Ph.D.

Odbor živočišných komodit a ochrany zvířat, Ministerstvo zemědělství

Metodika byla vypracována za podpory Ministerstva zemědělství v rámci řešení výzkumného projektu NAZV QK21010038.

Předkladatel: Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.

se sídlem Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves

zastoupený Dr. Ing. Pavlem Čermákem, ředitelem

Tel.: 00420 267 009 650, e-mail: vuzv@vuzv.cz

www.vuzv.cz

Zástupcem autorského týmu je Ing. Magdaléna Štolcová, Ph.D.

2024

Obsah

ÚVOD	4
I. CÍL METODIKY	5
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	6
Metodika experimentů	6
Statistická analýza	7
Výsledky	8
Rozdíly v NEMK, nádoji a složkách mléka podle stáda	8
Rozdíly v NEMK, nádoji a složkách mléka u dojnic rozdělených podle výskytu NEB	10
Predikce NEB na základě logistické regrese a analýzy ROC	12
Stanovení hraničních hodnot pro predikci dojnic v NEB	14
Závěr	21
III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	22
IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	22
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY	22
VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	24
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	26
VIII. SEZNAM ZKRATEK A POJMŮ	27
IX. SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A GRAFŮ	28

ÚVOD

Mezi nejčastější zdravotní problémy v chovech dojeného skotu patří poruchy plodnosti, mastitidy, nemoci končetin a metabolická onemocnění. Často za nimi stojí přítomnost hluboké negativní energetické bilance (**NEB**), která se objevuje na začátku laktace, kdy dojnice nejsou schopny přijmout dostatečné množství sušiny, aby naplnily energetické požadavky na geneticky podmíněnou vysokou produkci mléka. Dojnice tento nedostatek energie kompenzují mobilizací vlastních tukových zásob (Roche et al., 2013). Převládajícími mastnými kyselinami (**MK**) v tukové tkáni přežvýkavců jsou kyseliny palmitová (**C16:0**), stearová (**C18:0**) a olejová (**C18:1 cis-9**). Při NEB se tuková tkáň odbourává a jmenované MK se dostávají v podobě neesterifikovaných MK (**NEMK**) do krevního oběhu a poté se zabudovávají přímo do mléčného tuku (Tyburczy et al., 2008). Příliš vysoké koncentrace NEMK v krvi však dojnice nedokážou metabolizovat a ty se tak stávají toxickými. Vysoké hladiny NEMK jsou spojovány s vyšším rizikem vzniku onemocnění souvisejících s NEB, jako je ketóza, jaterní steatóza, dislokace slezu, mastitida a reprodukční onemocnění (Ospina et al., 2010; Jorjong et al., 2014; Van Saun, 2016; Hussein et al., 2020; Heirbaut et al., 2023).

Koncentrace NEMK v krevním séru jsou spolehlivým ukazatelem NEB, protože přímo odrážejí množství odbourané tukové tkáně. Hladina NEMK vyšší než 0,6 mmol/l u dojnic během prvních týdnů laktace je hraniční hodnotou pro diagnostiku NEB (Van Saun, 2016). Opakované odběry krevních vzorků a následná finančně, organizačně i časově náročná laboratorní analýza je však v běžné praxi plošně nepoužitelná. Kromě NEMK v krvi množství odbourané tukové tkáně, a tedy i riziko vzniku NEB, odráží také složení mléka, zejména pak obsahy MK mléčného tuku. Několik studií se zabývalo vztahy mezi sérovými koncentracemi NEMK a obsahem MK v mléčném tuku. Jako nejlepší pro odhad sérových koncentrací NEMK byly identifikovány obsahy kyseliny oktadecenové (**C18:1**), MK s dlouhým uhlíkovým řetězcem (**LCFA**), mononenasyčených MK (**MUFA**), kyseliny myristové (**C14:0**) a C18:0 (Jorjong et al., 2014; Mäntysaari et al., 2019; Pires et al., 2022, Štolcová et al., 2024). Všechny zmiňované MK mléčného tuku lze spolehlivě a levně stanovit metodou infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (**FTIR**), kterou se standardně analyzují vzorky mléka pro kontrolu mléčné užitkovosti (**KU**).

Pokud by existoval funkční test, kterým by byly včas odhaleny dojnice v NEB, chovatel by mohl začít dříve riziková zvířata léčit či provést některé preventivní zásahy. Tím by se zvýšila účinnost těchto opatření a tedy i šance na vyřešení problému s následným pozitivním dopadem na rentabilitu produkce mléka. Mezi základní preventivní opatření výskytu NEB patří správný management v období stání na sucho, podpora přirozených mechanismů odbourávání nadbytečných NEMK (například dostatek přirozeného pohybu) a podání jiných zdrojů energie. Pro včasný léčebný zásah u dojnic s podezřením na NEB se většinou využívají doplňky s obsahem rychlých zdrojů energie, například propylenglykol, který je rychle absorbován bachorem a konvertován na glukózu, a částečně, ještě před absorpcí, je metabolizován na propionát, který je hlavním substrátem pro glukoneogenezi. Dále se využívají veterinární léčivé preparáty na ochranu jater a stimulaci trávení (například menbuton).

Základní hypotézou předkládané metodiky je, že existují nepřímé ukazatele NEB, zejména MK mléčného tuku, které lze využít pro včasný odhad NEB a sestavit z nich diagnostický test využitelný v běžné chovatelské praxi.

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je nalézt metodu vhodnou pro predikci rizika vzniku NEB u dojnic na začátku laktace s využitím minoritních složek mléka, zejména MK mléčného tuku. Dojnice v NEB lze v rané fázi laktace diagnostikovat prostřednictvím koncentrace sérových NEMK. Tato metoda je však finančně, organizačně i časově náročná, proto je potřeba hledat nové diagnostické parametry, na jejichž základě by bylo možné spolehlivě klasifikovat dojnice s NEB a bez NEB.

Předkládaná metodika navrhuje postup, který chovateli dojeného skotu umožní provést analýzu vlastního stáda, zjistit složky mléka predikující NEB a stanovit optimální hraniční hodnoty, podle kterých lze zahájit preventivní či léčebná opatření.

Postupnými kroky metodiky byly:

- Analýza přímých (sérové NEMK) i nepřímých (složky mléka) ukazatelů NEB u dojnic v rané fázi laktace.
- Vyhodnocení rozdílů ve složení mléka mezi jednotlivými stády a mezi zdravými dojnicemi a dojnicemi v NEB.
- Určení, zda jsou složky mléka vhodné pro diagnostické odlišení zdravých jedinců a jedinců s NEB.
- Stanovení optimální hraniční hodnoty (prahový bod, dělicí bod, *angl.* cut-off point) na škále hodnot vybraného ukazatele pro dosažení diagnosticky nejlepších výsledků.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Metodika experimentů

Experimentální sledování dojnic v 5 stádech (A, B, C, D, E) probíhalo v období od srpna 2021 do prosince 2023. Všechna sledovaná stáda byla vybavena tandemovou dojírnou AfiMilk® (S. A. E., Afikim, Izrael) a nádoje z každého dojení byly automaticky zaznamenávány pomocí dojírenského softwaru AfiFarm™. Dojení ve stádě A probíhalo 3× denně, v ostatních 2× denně. Ve všech sledovaných stádech se krmilo 2× denně směsnou krmnou dávkou (TMR), která byla několikrát denně přihrnována automatickými přihrnovači krmiv. Dojnice v časně fázi laktace byly krmeny TMR založenou na kukuřičné siláži, vojtěškové senáži, seně, koncentrovaných krmivech a minerálně vitaminových doplňcích. Průměrné počty dojnic a průměrná mléčná užitkovost jednotlivých stád za normovanou laktaci v době experimentů jsou uvedeny v TABULCE 1.

Tabulka 1: Charakteristika stád zařazených do experimentů

Stádo	A	B	C	D	E
Kraj	Zlínský	Středočeský	Středočeský	Vysočina	Středočeský
Počet dojených krav ve stádě	1 130	200	490	250	300
Mléčná užitkovost za normovanou laktaci (kg)	11 580	9 330	10 270	10 070	9 870
Převažující plemenná příslušnost	Holštýnský skot	Holštýnský skot	Holštýnský skot	Holštýnský skot	Holštýnský skot
Počet krav zařazených do experimentu	84	195	165	76	212
Experimentální období	3–5/2024	8/2021–6/2022	10/2022–1/2023	9–12/2023	10/2021–6/2022

Do samotného experimentu bylo zařazeno celkem 732 dojnic (podrobněji TABULKA 1) od 3. do 35. dne laktace. Všechna stáda byla sledována vždy v rámci provádění měsíční KU. V den KU byly provedeny odběry krevních vzorků vždy ve stejný čas (mezi 7.–10. hodinou) a vzorky mléka byly odebírány podle metodiky KU.

Ze vzorků krve byly v Klinické laboratoři pro velká zvířata při Veterinární univerzitě v Brně pomocí automatického biochemického analyzátoru měřeny koncentrace NEMK, které jsou klíčové pro diagnostiku NEB. Analýza vzorků mléka probíhala v Laboratoři pro rozbor mléka v Brně při Českomoravské společnosti chovatelů, a.s. metodou FTIR. Ze základních složek byly využity obsahy tuku, proteinu a laktózy a byl dopočítán poměr tuku a bílkovin (T:P). Dále byly analyzovány obsahy MK mléčného tuku, a to jak skupin MK, tak obsahově významných individuálních MK. Veškeré hodnocené parametry jsou podrobně popsány v TABULCE 2. Všechny složky mléka byly pro účely této metodiky počítány jako denní průměr. Všechny mastné kyseliny analyzované metodou FTIR jsou v jednotkách g/100 g mléka a byly dále přepočítány na jednotky g/100 g mléčného tuku podle následující rovnice:

$$MK \text{ (g/100 g tuku)} = \frac{MK \text{ (g/100 g mléka)}}{\text{obsah tuku (\%)}} \times 100.$$

Tabulka 2: Analyzované parametry z krve a mléka

Analyzované parametry
Krev
NEMK – neesterifikované mastné kyseliny (mmol/l)
Mléko
Základní složky mléka (%)
tuk
bílkovina
laktóza
T:P – poměr tuku k bílkovinám
Mastné kyseliny mléčného tuku (g/100 g mléka)
SFA – nasycené mastné kyseliny (bez dvojně vazby)
tUFA – celkové nenasycené mastné kyseliny (100 - SFA)
SCFA – mastné kyseliny s krátkým uhlíkovým řetězcem (C4 – C10)
MCFA – mastné kyseliny se středně dlouhým uhlíkovým řetězcem (C12 – C16)
LCFA – mastné kyseliny s dlouhým uhlíkovým řetězcem (C18 a delší)
MUFA – mononenasyčené mastné kyseliny (s jednou dvojnou vazbou)
PUFA – polynenasycené mastné kyseliny (se dvěma a více dvojnými vazbami)
C14:0 – kyselina myristová
C16:0 – kyselina palmitová
C18:0 – kyselina stearová
C18:1 – kyselina oktadecenová

Statistická analýza

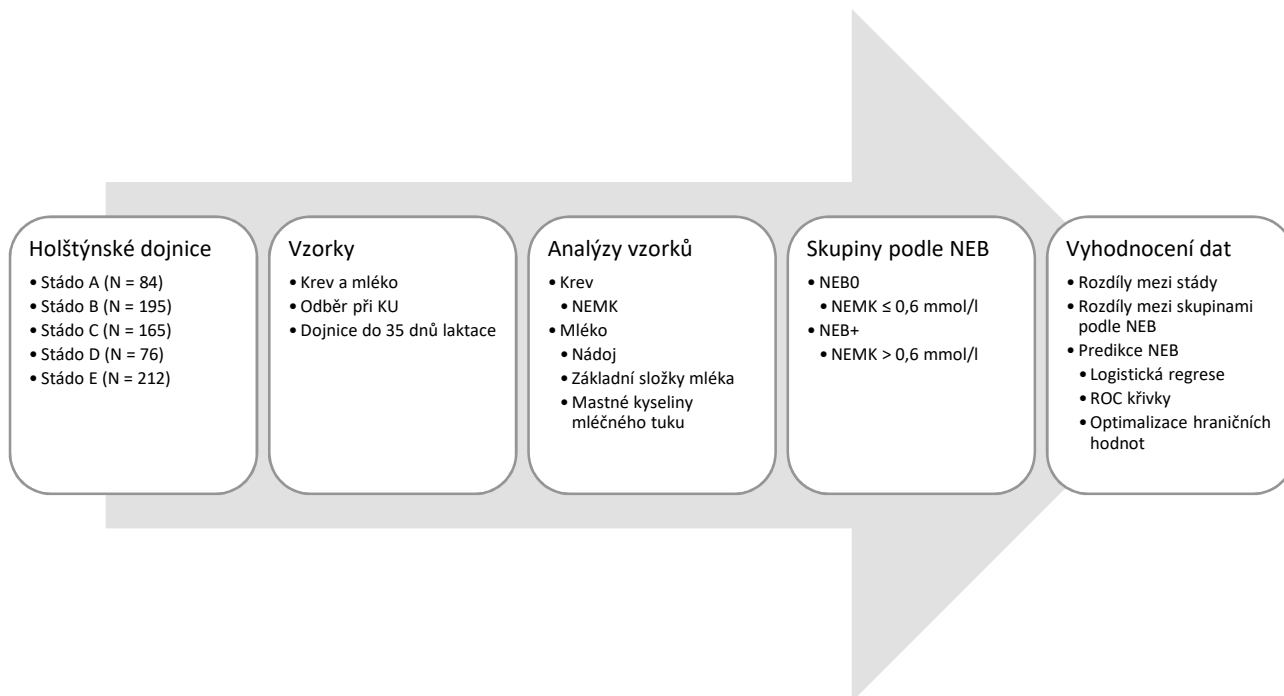
Statistická analýza a hodnocení dat byly provedeny s využitím software SAS (verze 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC). Výsledky rozborů krve a mléka byly podrobeny klasické explorační analýze. Odlehlé hodnoty ($\pm 4SD$ od průměru) byly z dalšího zpracování vyloučeny. Posouzení normality dat konstatovalo u vysvětlované proměnné NEMK odchylku od normálního rozdělení. K normalizaci dat byla využita logaritmická transformace s vytvořením nové proměnné $\ln NEMK$. Vliv pevných efektů (stádo, rok otelení, měsíc otelení, pořadí laktace) na složky mléka byl analyzován pomocí zobecněného lineárního modelu (PROC GLM). Významnost rozdílů mezi stády byla vyhodnocena pomocí příkazu CONTRAST.

Dojnice byly na základě hladiny NEMK v krvi rozděleny do dvou skupin: dojnice bez NEB – **NEB0** (NEMK < 0,6 mmol/l) a dojnice s NEB – **NEB+** (NEMK \geq 0,6). Následně byla zavedena binární proměnná NEB s hodnotami 0 (NEB0) a 1 (NEB+). Rozdíly v nádoji a složkách mléka mezi skupinami byly vyhodnoceny t-testem. Výběh modelu pro predikci NEB byl proveden metodou logistické regrese (PROC LOGISTIC) na základě srovnání hodnot Akaiikova (AIC) a Schwarzova (SC) kritéria při postupném zadávání vysvětlujících proměnných do modelu. Pro obě kritéria platí, že čím nižší hodnoty dosahují, tím lépe se model shoduje s empirickými hodnotami závislé proměnné. Významnost vysvětlujících proměnných byla posouzena pomocí Waldova testu s jejich zařazením do modelové rovnice při $p < 0,05$. Vybraný model poskytl odhady parametrů, po jejichž dosazení do modelové rovnice byly příkazem *roc* dopočteny a do výstupního souboru vypsány predikované pravděpodobnosti ($\widehat{\pi}$), že NEB = 1, senzitivita a specificita modelu. Na základě těchto vstupů byly sestaveny Receiver Operating Characteristic (**ROC**) křivky. Grafy se zobrazením plochy pod křivkou (Area Under the Curve, **AUC**) a jednotlivých hraničních hodnot (Youdenův index, Euklidovská

vzdálenost, Index of Union) byly sestrojeny s využitím makra *rocplot* (viz <https://support.sas.com/kb/25/018.html>).

Zjednodušený popis metodického postupu je znázorněn na OBRÁZKU 1.

Obrázek 1: Schematické znázornění metodického postupu



Výsledky

Rozdíly v NEMK, nádoji a složkách mléka podle stáda

Byly hodnoceny koncentrace sérových NEMK, nádoje a složky mléka u dojnic od 3 do 35 dnů laktace a byly počítány rozdíly mezi jednotlivými stády. V TABULCE 3 jsou uvedeny průměry všech sledovaných proměnných opravené metodou nejmenších čtverců (LSMeans) o vliv měsíce odběru a pořadí laktace včetně znázornění signifikantních rozdílů mezi stády.

V koncentracích sérových NEMK nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými stády. Mléčná užitkovost dojnic od 3. do 35. dne laktace byla ve všech sledovaných stádech také vyrovnaná (od 35,6 do 37,2 kg/den). V základních složkách mléka byly zjištěny signifikantní rozdíly v obsahu tuku a v poměru T:P. Obsah mléčného tuku (3,7 %) a poměru T:P (1,12) byl nejnižší ve stádě B. V obsahu bílkovin a laktózy nebyly zjištěny signifikantní rozdíly. Také v obsahu MK mléčného tuku byly nalezeny významné rozdíly. Největší vliv na složení a obsah MK v mléčném tuku má výživa a metabolický stav zvířat, jehož význam je markantní v prvních týdnech laktace. Nejvyšší obsah SFA byl ve stádě D a C, kde byl zjištěn zároveň i nejnižší obsah tUFA. Naopak nejnižší obsah SFA a nejvyšší obsah tUFA byl zjištěn ve stádě E. Obsahy těchto dvou skupin MK jsou fyziologicky protichůdné; čím vyšší je obsah SFA, tím méně jsou zastoupeny tUFA.

Z hlediska NEB mají význam LCFA, MUFA, C18:1 (patří mezi MUFA i LCFA), jejichž nejvyšší obsahy byly zjištěny ve stádě D (u LCFA byly nejvyšší obsahy ve stádě D a E). Tyto MK se do mléka dostávají při NEB metabolickým

rozpadem tukové tkáně, při kterém se MK v podobě NEMK dostanou do krve a dále se zabudovávají přímo do mléčného tuku. Lze tedy tvrdit, že zvýšený obsah LCFA, MUFA a C18:1 v mléčném tuku v porovnání s průměrem stáda značí vyšší riziko vzniku NEB a souvisejících zdravotních poruch. To bylo potvrzeno skutečností, že stádo D mělo numericky nejvyšší koncentraci NEMK a tedy nejvyšší výskyt NEB (GRAF 1).

Obsah LCFA v mléce inhibuje syntézu ostatních MK s kratším uhlíkovým řetězcem, tj. C ≤ 16 (Stoop et al., 2009), což je patrné ve stádě D, kde byl zaznamenán (spolu se stádem E) nejnížší obsah C14:0.

Neplatí to v případě SCFA, jejichž obsah byl nejnížší ve stádě E a naopak ve stádě D byl nejvyšší. Může to být tím, že do SCFA patří kyselina máselná, jejíž syntéza není nijak ovlivněna množstvím LCFA (Palmquist et al., 1993).

Nejnížší obsahy MCFA a C16:0, která mezi MCFA náleží, byly zaznamenány ve stádě E. Interpretace jejich obsahu v mléčném tuku je však poměrně obtížná, jelikož C16:0 má komplikovaný metabolismus a při NEB se může její obsah zvýšit, ale také snížit (Litherland et al., 2011).

Tabulka 3: Rozdíly mezi stády v koncentraci sérových NEMK, nádoji a složkách mléka u dojníc od 3. do 35. dne laktace (průměr odhadnutý metodou nejmenších čtverců)

	A	B	C	D	E
N	84	195	165	76	212
NEMK (mmol/l)	0,40	0,33	0,32	0,42	0,38
Nádoj (kg/den)	37,19	34,58	35,80	36,65	35,04
Základní složky mléka (%)					
Bílkoviny	3,32	3,29	3,24	3,34	3,33
Tuk	4,09 ^a	3,70 ^c	4,21 ^a	4,01 ^b	4,17 ^{ab}
T:P	1,23 ^{ab}	1,12 ^c	1,30 ^a	1,20 ^b	1,25 ^{ab}
Laktóza	5,02	5,00	4,96	4,97	4,97
Mastné kyseliny mléčného tuku (g/100 g tuku)					
SFA	61,06 ^b	60,53 ^b	65,53 ^a	65,63 ^a	57,62 ^c
tUFA	33,95 ^b	34,47 ^b	29,47 ^c	29,37 ^c	37,37 ^a
SCFA	10,79 ^c	10,96 ^c	12,71 ^b	13,41 ^a	10,23 ^d
MCFA	35,20 ^{ab}	36,40 ^a	37,10 ^a	33,91 ^b	30,47 ^c
LCFA	37,84 ^b	38,18 ^b	37,75 ^b	42,17 ^a	42,03 ^a
MUFA	28,60 ^c	29,44 ^c	29,50 ^c	34,35 ^a	30,75 ^b
PUFA	2,61 ^d	3,12 ^b	2,87 ^c	2,74 ^{cd}	3,30 ^a
C14:0	9,29 ^{ab}	9,12 ^b	9,57 ^a	8,03 ^c	8,01 ^c
C16:0	25,38 ^b	25,93 ^b	27,31 ^a	24,63 ^b	22,45 ^c
C18:0	10,98 ^{bc}	10,74 ^{bc}	10,57 ^c	11,24 ^b	12,59 ^a
C18:1	26,36 ^c	28,22 ^b	28,99 ^b	36,22 ^a	28,49 ^b
C18:C14	2,98 ^c	3,25 ^c	3,31 ^c	4,71 ^a	3,77 ^b

Pozn.: NEMK = neesterifikované mastné kyseliny; T:P = poměr tuku a proteinu; SFA = nasycené mastné kyseliny; tUFA = celkové nenasycené mastné kyseliny; SCFA = mastné kyseliny s krátkým uhlíkovým řetězcem; MCFA = mastné kyseliny se středně dlouhým uhlíkovým řetězcem; LCFA = mastné kyseliny s dlouhým uhlíkovým řetězcem; MUFA = mononenasyčené mastné kyseliny; PUFA = polynenasycené mastné kyseliny; C14:0 = kyselina myristová; C16:0 = kyselina palmitová; C18:0 = kyselina stearová; C18:1 = kyselina oktadecenová

C18:C14 = poměr kyseliny oktadecenové a myristové

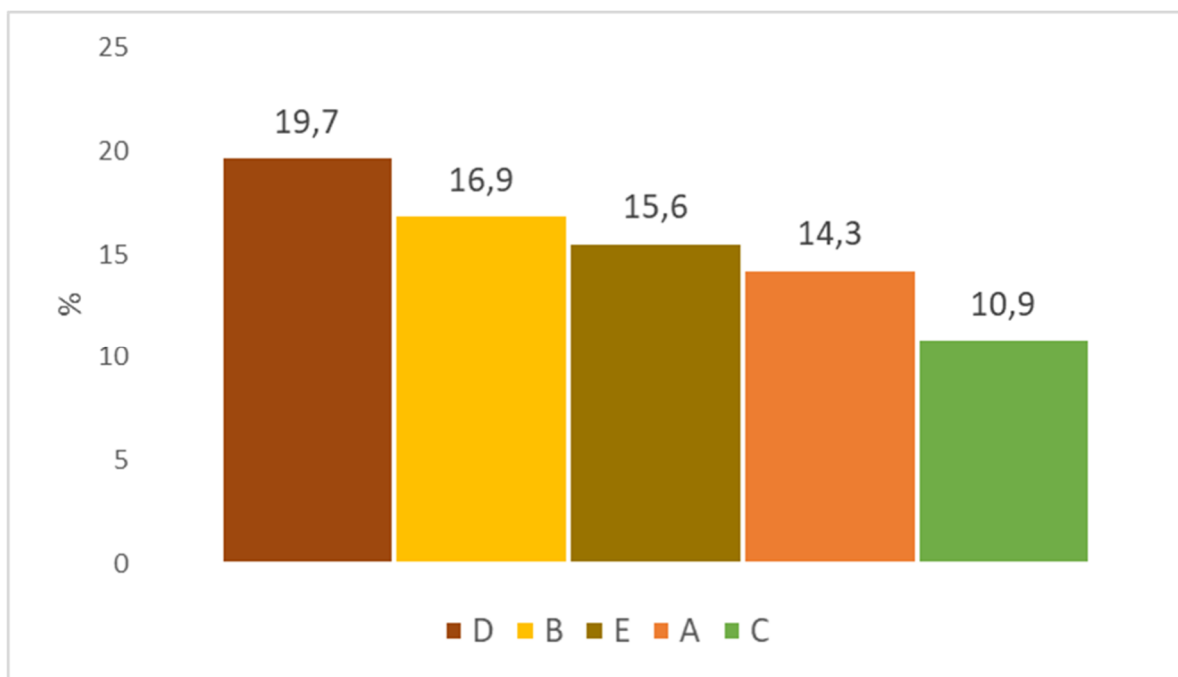
a, b, c, d = stáda se významně liší (p < 0,05).

Rozdíly v NEMK, nádoji a složkách mléka u dojnic rozdělených podle výskytu NEB

Aby bylo možné predikovat NEB na základě složek mléka, bylo potřeba nejprve dojnice diagnostikovat pomocí měření koncentrací NEMK v krvi, což je nejčastěji používaná metoda („zlatý standard“) pro hodnocení NEB. Dojnice trpící NEB na začátku laktace mají hladiny sérových NEMK vyšší než 0,6 mmol/l (Van Saun, 2016). Námi sledované dojnice od 3. do 35. dne laktace tedy byly rozděleny podle koncentrace NEMK v krvi na dvě skupiny definované jako: skupina NEB+ (dojnice s NEB, NEMK > 0,6 mmol/l) a skupina NEB0 (zdravé dojnice bez NEB, NEMK ≤ 0,6 mmol/l).

Z celkových 732 sledovaných dojnic bylo mezi 3. a 35. dnem laktace v NEB+ 111, tj. 15 %. Nejvyšší podíl dojnic s NEB byl ve stádě D (téměř 20 %), zatímco nejméně ve stádě C (11 %). Podrobně je podíl dojnic s NEB v jednotlivých stádech zobrazen v GRAFU 1. Je však k dispozici jen málo studií, které by se v minulosti zaměřovaly na monitoring výskytu NEB. Například ve Velké Británii, kde v letech 2006 až 2015 autoři sledovali více než 84 tisíc krav z 1748 farem, byl výskyt NEB u dojnic v prvních 20 dnech laktace 40 % (Macrae et al., 2019). V našem předchozím experimentu jsme zjistili NEB u 42 % dojnic v prvních 2 týdnech laktace (Štolcová et al., 2020). S rostoucími dny v laktaci klesá riziko vzniku NEB. Nicméně i zde zjištěných 15 % je poměrně značná část stáda.

Graf 1: Podíl dojnic NEB+ v jednotlivých chovech



Mezi skupinami NEB+ a NEB0 byly zjišťovány rozdíly v sérové koncentraci NEMK, denním nádoji a složkách mléka, jak ukazuje TABULKA 4.

Dojnice byly do skupin NEB+ a NEB0 zařazovány na základě koncentrace sérových NEMK, proto je logické, že dojnice ve skupině NEB+ mají signifikantně vyšší sérové NEMK než dojnice ve skupině NEB0. Přítomnost NEB je často spojována s poklesem mléčné užitkovosti (Leduc et al., 2021), což odpovídá i našemu zjištění, kdy dojnice ve skupině NEB+ měly denní nádoj signifikantně nižší (o cca 2 kg/den).

Rozdíly v základních složkách mléka reflektují přítomnost NEB, kdy se u skupiny NEB+ vyskytují vyšší hodnoty tuku a poměru T:P. V literatuře se lze setkat s odhadem NEB pomocí T:P, přičemž nejčastěji se za hraniční hodnoty považuje T:P vyšší než 1,5 nebo 1,3. Využívání samotného poměru T:P pro odhalování NEB bohužel

není příliš spolehlivé, jelikož výsledky jsou často falešně pozitivní (tj. je identifikována NEB v případě, kdy to neodpovídá pravdě). To je způsobeno tím, že vysoký poměr T:P sice naměříme v mléce s vysokým obsahem tuku a současně normálním obsahem bílkovin, kdy je na vině mobilizace tělesného tuku při NEB. Ale vysoký poměr T:P může být také v mléce s normálním obsahem tuku a nízkým obsahem bílkovin, a pak je problém potřeba hledat ve výživě dojníc. Odhad NEB pomocí poměru T:P selhával i v našem předchozím experimentu (Štolcová et al., 2023).

Také rozdíly ve složení MK mléčného tuku odpovídají metabolickému stavu zvířat. Ve skupině NEB+ byl nižší obsah SFA a naopak vyšší obsah tUFA, což odpovídá vyšším obsahům MUFA, C18:1, a PUFA. U skupiny NEB+ byl také zjištěn vyšší obsah LCFA a C18:0. Jak bylo popsáno výše, dojnice s NEB musí pro zajištění energie odbourávat tukové zásoby, které se dostávají do krve v podobě NEMK a ty jsou dále přenášeny do mléka a zabudovávají se do mléčného tuku, zejména ve formě C18:1 a jiných LCFA a MUFA. Vyšší obsah LCFA v mléce blokuje syntézu MK s kratším uhlíkovým řetězcem a proto dojnice ve skupině NEB+ měly významně nižší obsahy SCFA, MCFA a s tím související C16:0 a C14:0 ve srovnání s dojnicemi ze skupiny NEB0.

Tabulka 4: Rozdíly v sérové koncentraci NEMK, denním nádoji a složkách mléka mezi skupinami dojníc podle výskytu NEB ve všech stádech dohromady

Proměnná	NEB0	NEB+
N	621	111
NEMK (mmol/l)	0,27 ^b	0,88 ^a
Nádoj (kg/den)	37,01 ^a	35,15 ^b
Základní složky mléka (%)		
Bílkoviny	3,31	3,36
Tuk	3,93 ^b	4,62 ^a
T:P	1,19 ^b	1,38 ^a
Laktóza	5,00 ^a	4,88 ^b
Mastné kyseliny mléčného tuku (g/100 g tuku)		
SFA	62,30 ^a	58,43 ^b
tUFA	32,70 ^b	36,57 ^a
SCFA	11,65 ^a	10,63 ^b
MCFA	35,85 ^a	30,57 ^b
LCFA	38,37 ^b	44,33 ^a
MUFA	29,28 ^b	33,18 ^a
PUFA	2,99 ^b	3,22 ^a
C14:0	9,16 ^a	7,59 ^b
C16:0	25,78 ^a	22,82 ^b
C18:0	11,05 ^b	12,78 ^a
C18:1	28,05 ^b	32,06 ^b
C18:C14	3,23 ^b	4,47 ^a

Pozn.: NEMK = neesterifikované mastné kyseliny; T:P = poměr tuku a proteinu; SFA = nasycené mastné kyseliny; tUFA = celkové nenasycené mastné kyseliny; SCFA = mastné kyseliny s krátkým uhlíkovým řetězcem; MCFA = mastné kyseliny se středně dlouhým uhlíkovým řetězcem; LCFA = mastné kyseliny s dlouhým uhlíkovým řetězcem; MUFA = mononenasycené mastné kyseliny; PUFA = polynenasycené mastné kyseliny; C14:0 = kyselina myristová; C16:0 = kyselina palmitová; C18:0 = kyselina stearová; C18:1 = kyselina oktadecenová;

C18:C14 = poměr kyseliny oktadecenové a myristové;

a, b = stáda se významně liší ($p < 0,05$)

Predikce NEB na základě logistické regrese a analýzy ROC

K predikci NEB byla použita binární logistická regrese, pro kterou je charakteristické, že závisle proměnná je dichotomická (tj. nabývá právě dvou hodnot). Nejčastěji se jedná o situaci, kdy sledujeme určitý jev, a zajímá nás, zda nastane, nebo nenastane.

V našem případě jsme zjišťovali, zda dojnice trpí NEB (NEB = 1), nebo nikoli (NEB = 0). Logistická regrese umožňuje odhalit faktory, které ovlivňují, zda sledovaný jev nastane a posoudit míru jejich vlivu. Jako možné prediktory byly v našem případě do modelů postupně zařazovány výše denního nádoje, obsah mléčného tuku, bílkovin a laktózy, poměr T:P, obsahy MK vyjádřené v g/100 g mléčného tuku a poměr C18:1 ku C14:0. Modely byly odhadnuty pro každé stádo zvlášť a zároveň byl sestrojen závěrečný model spojující všech pět stád dohromady.

Ukázalo se, že pro predikci NEB mají význam obsah mléčného tuku, obsahy C18:1 a C18:0 a v jednom případě (stádo D) byl významný obsah mléčné bílkoviny. Ostatní parametry nebyly v kombinaci s výše uvedenými statisticky významné. Výsledné rovnice pro všechna stáda jsou uvedeny v TABULCE 7. Pro využití v praxi je velmi pozitivní, že téměř ve všech případech predikovaly NEB stejné složky mléka.

Hlavními ukazateli binárních diagnostických testů, které dávají výstupy pozitivní/negativní, jsou: senzitivita a specifita. Jejich definice jsou podle Duška et al. (2011a) následující:

- Senzitivita (**Se**) vyjadřuje schopnost testu správně diagnostikovat jedince jako nemocného. Jinými slovy vyjadřuje pravděpodobnost, že test bude pozitivní u skutečně nemocných jedinců. Počítá se jako podíl počtu pozitivních výsledků testu u nemocných a celkového počtu nemocných jedinců; $Se = a/(a + c)$.
- Specifita (**Sp**) vyjadřuje schopnost testu negativně vyhodnotit zdravé jedince. Vyjadřuje tedy pravděpodobnost, že test bude negativní u zdravých jedinců. Počítá se jako podíl počtu negativních výsledků testu u zdravých a celkového počtu zdravých jedinců; $Sp = d/(b + d)$.

Senzitivita a specifita nejsou závislé na prevalenci daného onemocnění, jelikož výpočet probíhá v rámci sloupců tabulky četností (viz TABULKA 5). Základní vyhodnocení diagnostického testu podle senzitivity a specifity je znázorněno v TABULCE 6.

Tabulka 5: Vstupní data diagnostického testu: 2 × 2 tabulka četností

		Skutečnost – stav jedince		
		Nemocný	Zdravý	Celkem
Diagnostický test	Pozitivní	a	b	a + b
	Negativní	c	d	c + d
	Celkem	a + c	b + d	a + b + c + d

Tabulka 6: Základní vyhodnocení diagnostického testu

		Skutečnost – stav jedince	
		Nemocný	Zdravý
Diagnostický test	Pozitivní	správná pozitivita SP	falešná pozitivita FP
	Negativní	falešná negativita FN	správná negativita SN

Pro hodnocení výkonnosti modelu a pro vizualizaci vhodnosti jeho využití jako diagnostického testu byly sestrojeny ROC křivky.

Křivka ROC je standardním nástrojem pro grafickou vizualizaci výstupů diagnostických testů. Konstrukce křivky využívá faktu, že jakákoli hodnota spojité proměnné X (označujeme x_i , kde $i = 1, \dots, n$) nějak rozlišuje zdravé a nemocné jedince, a tedy každá hodnota x_i je spojena s nějakou specificitou a senzitivitou. Křivku ROC získáme spojením bodů určených senzitivitou a hodnotou $(1 - \text{specificita})$, které přísluší jednotlivým hodnotám proměnné X . Smyslem analýzy ROC je určit diagnostickou vhodnost testu (Dušek et al., 2011b).

Pokud ROC křivka leží nad diagonálou, znamená to, že test správně určuje rozdíl mezi zdravými a nemocnými jedinci. Čím blíže se křivka nachází levému hornímu rohu $(0, 1)$, tím lepší je diagnostická významnost. Pokud je křivka umístěna na diagonále, značí to, že obě diagnostikované populace byly klasifikovány zcela náhodně. Pokud se křivka nachází pod diagonálou, pak jsou výsledky testu zcela zavádějící. Jako statistické vyjádření diagnostické schopnosti testu se používá výpočet plochy pod křivkou (AUC). Pokud je AUC 0,5, znamená to náhodné rozlišení dvou populací (křivka na diagonále). Maximální hodnota je 1, což značí zcela správnou klasifikaci na populaci zdravých a nemocných bez vzájemného překryvu (Hassandaz et Hajian-Tilaki, 2024). V literatuře lze nalézt třídění hodnot AUC, které kvantifikuje diagnostickou sílu testů a podle nejčastějšího členění lze test s AUC nad 0,8 považovat za velmi dobře diskriminující (Mandrekar, 2010; Dušek et al., 2011b).

Hodnoty AUC se také využívají pro porovnání dvou nebo více diagnostických testů, přičemž čím vyšší hodnota AUC, tím je samozřejmě vyšší přesnost testu. Hodnoty AUC se v případě námi posuzovaných stád pohybovaly od 0,801 do 0,877, což ukazuje na velmi dobrou diagnostickou vhodnost testu (podrobně uvedeno v TABULCE 7). Nejnižší AUC byla u stáda D, ve kterém byly signifikantní efekty obsahu bílkovin a obsahu C18:1, což se liší od ostatních stád, kde byl pomocí logistického regresního modelu vybrán obsah tuku, obsah C18:1 a C18:0. Obsah C18:0 nebyl průkazný ve stádě A. U modelu pro všechna stáda dohromady dosáhla AUC hodnoty 0,82, což značí také velmi dobrou diagnostickou schopnost. Přesto z důvodu poměrně nízkého počtu zvířat v pokusu není možné tento model zatím považovat za zcela univerzální. Další výzkum by proto měl být směřován na získání doplňujících dat, na jejichž základě bude možné zobecnit dosažené výsledky pro celou populaci.

Tabulka 7: Výsledné modely a plocha pod křivkou (AUC) pro jednotlivá stáda i pro soubor všech stád dohromady

Stádo	N	Výsledný model	AUC
A	84	$NEB = -15,82 + 1,55 \times tuk + 0,23 \times C18:1$	0,88
B	195	$NEB = -14,73 + 0,66 \times tuk + 0,03 \times C18:1 + 0,42 \times C18:0$	0,83
C	165	$NEB = -14,42 + 0,88 \times tuk + 0,05 \times C18:1 + 0,57 \times C18:0$	0,86
D	76	$NEB = -15,55 + 0,29 \times C18:1 + 1,25 \times \text{bílkovina}$	0,80
E	212	$NEB = -19,25 + 1,23 \times tuk + 0,18 \times C18:1 + 0,52 \times C18:0$	0,87
Celkem	732	$NEB = -12,42 + 0,77 \times tuk + 0,12 \times C18:1 + 0,32 \times C18:0$	0,82

Pozn.: NEB = negativní energetická bilance, AUC = plocha pod křivkou, C18:1 = kyselina oktadecenová, C18:0 = kyselina stearová

Stanovení hraničních hodnot pro predikci dojnic v NEB

Základní výhodou ROC křivek je možnost jejich použití pro určení optimální hraniční hodnoty pro kvantitativní biomarkery (Hassandaz et Hajian-Tilaki, 2024). Pro stanovení optimálních hraničních hodnot byla popsána řada metod, přičemž diagnosticky nejlepší jsou takové, které nabízejí maximální součet hodnot senzitivity a specifity a vybalancovávají tak pravděpodobnost falešně pozitivních a falešně negativních závěrů (Dušek et al., 2011b).

Existuje několik studií, ve kterých autoři porovnávali různé metody stanovení hraničních hodnot, přičemž většina doporučuje pro získání optimálních hraničních hodnot použít Youdenův index, Euklidovskou vzdálenost a Index of Union (Unal, 2017; Hajian-Tilaki, 2018; Perkins et Schisterman, 2006; Gerke et Zapf, 2022). Na základě těchto doporučení byly tyto tři metody využity i v případě této metodiky.

Youdenův index

Youdenův index používá maximální vertikální vzdálenost křivky ROC od bodu (X, Y) na diagonále (náhodné přímce). Tento index ve skutečnosti maximalizuje rozdíl mezi mírou senzitivity a falešné positivity, jinými slovy maximalizuje procento správné klasifikace (Hajian-Tilaki, 2018).

Výpočet Youdenova indexu: $Y_i = Se + Sp - 1 = Se - (1 - Sp)$

kde: Se je Senzitivita; Sp je specifita

Euklidovská vzdálenost

Dalším způsobem určení optimálních hraničních hodnot je použití euklidovské vzdálenosti od souřadnic (0, 1) v levém rohu plochy ROC. Při této metodě se optimální hraniční hodnota určuje podle principu, že AUC by měla být maximální. Vzdálenost mezi souřadnicemi (0, 1) a křivkou ROC by tedy měla být minimalizována (Nahm, 2022).

Euklidovská vzdálenost je definována takto: $Euklidovská\ vzdálenost = \sqrt{(1 - Se)^2 + (1 - Sp)^2}$

kde: Se je senzitivita; Sp je specifita

Index of Union

Index of Union (**IU**) využívá absolutní rozdíl mezi diagnostickou mírou a hodnotou AUC k minimalizaci míry chybné klasifikace. Tato metoda nevyžaduje složité výpočty, protože pouze kontroluje, zda se senzitivita a specifita při optimální hraniční hodnotě dostatečně blíží hodnotám AUC. Výhodou této metody je, že má ve většině případů lepší diagnostický výkon než jiné metody (Unal, 2017).

Index of Union se vypočítá podle následujícího vzorce: $IU = |Se - AUC| + |Sp - AUC|$

kde: Se je senzitivita; Sp je specifita; AUC je plocha pod křivkou (Area Under the Curve)

Pro praktické užití se jeví jako nevhodnější metoda IU, protože pro zjištění hodnoty charakterizující optimální hraniční bod není třeba složitějších výpočtů. Výsledky všech tří metod jsou srovnatelné: při použití optimálního hraničního bodu stanoveného metodou IU jsme dostali ve srovnání s Youdenovým indexem a Euklidovskou vzdáleností ve stádě A o 4 % nižší specifitu, ve stádě D o 2 % nižší specifitu; ve stádě E ve srovnání s Youdenovým indexem o 6 % nižší senzitivitu a o 2 % vyšší specifitu. Pouze ve stádě C optimální hraniční bod stanovený metodou IU vedl k výrazně nižší senzitivě (-17 %) a pouze o 1 % vyšší specifitě. V hodnocení celkových dat byla pak s metodou IU dosažena o 4 % vyšší senzitivita a o 8 % nižší

specifická. Hraniční hodnoty pro jednotlivá stáda se pro IU pohybovaly od 0,10 do 0,23, a s využitím modelu pro všechna stáda dohromady byla hraniční hodnota stanovena na 0,15. Zde je potřeba mít na paměti, že v našem případě křivka ROC nevykresluje pouze jednu proměnnou, ale jedná se soubor prediktorů vypočítaných na základě logistické regrese. Proto i hraniční hodnoty jsou výsledkem regresních rovnic pro dané stádo. Ke každé hraniční hodnotě se váže senzitivita a specifická. Pro hraniční hodnoty optimalizované metodou IU se senzitivita pohybovala v intervalu od 0,72 do 0,83 a specifická od 0,73 do 0,83. Jinými slovy lze říci, že testy vytvořené na základě predikce ze složek mléka správně odhalí 72 až 83 % skutečně pozitivních jedinců s NEB a zároveň míra falešné positivity ($1 - Sp$) bude od 17 do 27 %. Výsledky hraničních hodnot, senzitivity a specifický pro metodu IU jsou zobrazeny v TABULCE 8.

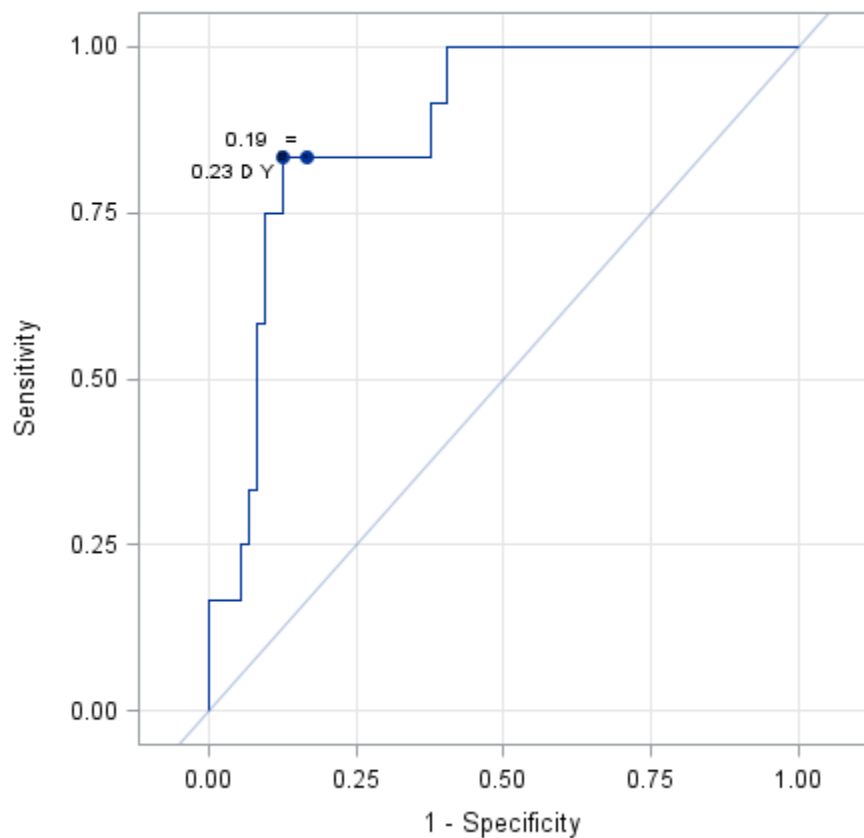
Tabulka 8: Hraniční hodnoty zjištěné metodou Index of Union (IU), senzitivita, specifická a míra falešné positivity pro jednotlivá stáda i pro soubor všech stád dohromady

Stádo	N	Hraniční hodnota (IU)	Senzitivita	Specifická	Falešná pozitivita (%)
A	84	0,190	0,83	0,83	17
B	195	0,170	0,76	0,75	25
C	165	0,100	0,72	0,75	25
D	76	0,231	0,80	0,80	20
E	212	0,189	0,79	0,79	21
Celkem	73	0,151	0,73	0,73	27

Pozn.: IU = Index of Union, NEB = negativní energetická bilance

Vlastní ROC křivky včetně vykreslení hraničních hodnot zjištěných pomocí Youdenova indexu (**Y**), Euklidovské vzdálenosti (**D**) a Index of Union (=) pro jednotlivá stáda i pro soubor všech stád dohromady jsou zobrazeny v GRAFECH 2–7. Podrobné údaje k hraničním hodnotám s výsledky senzitivity, specifický a mírou falešné positivity jsou v TABULKÁCH 9–14.

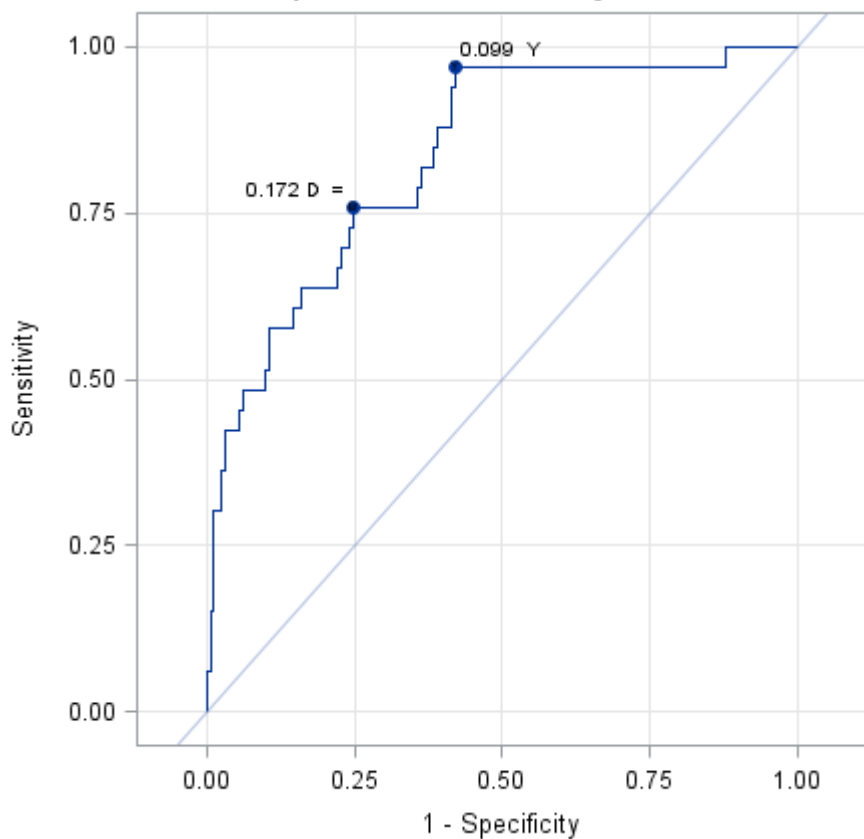
Graf 2: ROC křivka s vyobrazením hraničních hodnot pro stádo A (AUC = 0,88)



Tabulka 9: Hraniční hodnoty, senzitivita (Se), specifická (Sp) a míra falešné positivity (FP) pro stádo A

Metoda	Symbol	Hraniční hodnota	Označení	Hodnota indexu	Se	Sp	FP (%)
Euklid	D	0,22963	0,23 D Y	0,20833	0,83	0,87	13
IU	=	0,18973	0,19 =	0,00000	0,83	0,83	17
Youden	Y	0,22963	0,23 D Y	0,70833	0,83	0,87	13

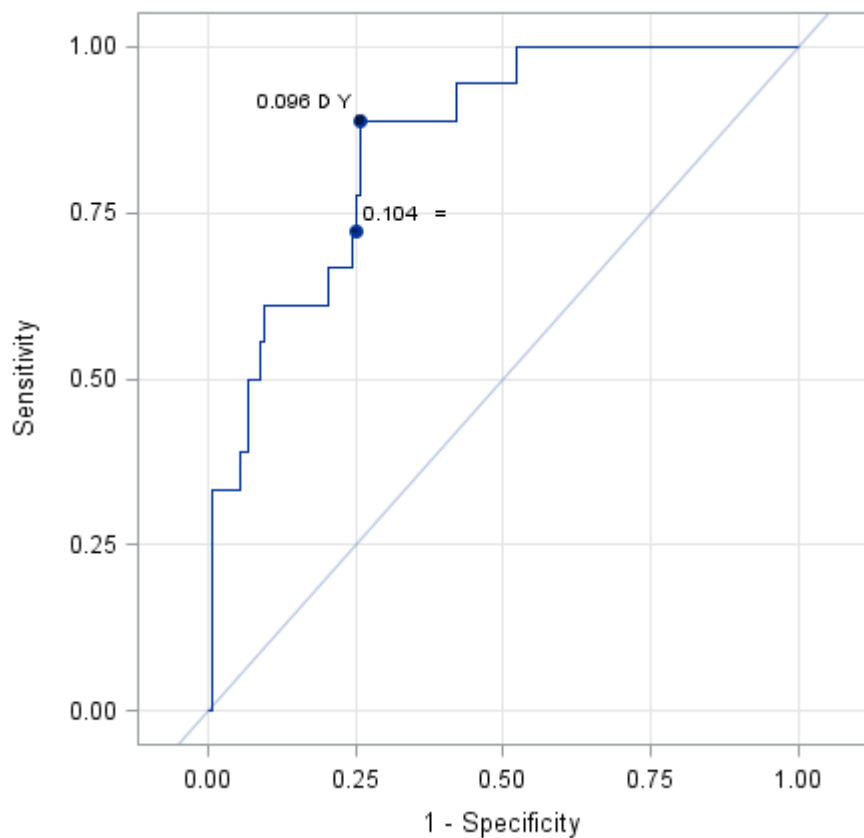
Graf 3: ROC křivka s vyobrazením hraničních hodnot pro stádo B (AUC = 0,83)



Tabulka 10: Hraniční hodnoty, senzitivita (Se), specifická (Sp) a míra falešné positivity (FP) pro stádo B

Metoda	Symbol	Hraniční hodnota	Označení	Hodnota indexu	Se	Sp	FP (%)
Euklid	D	0,17213	0,172 D =	0,34603	0,76	0,75	25
IU	=	0,17213	0,172 D =	0,00449	0,76	0,75	25
Youden	Y	0,09854	0,099 Y	0,54994	0,97	0,58	42

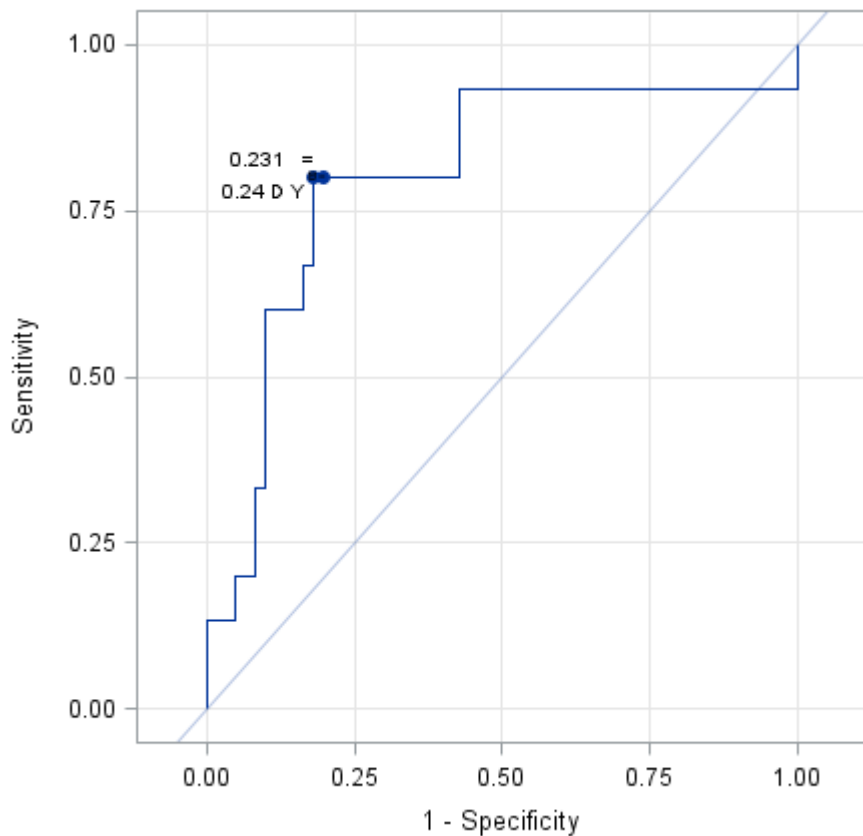
Graf 4: ROC křivka s vyobrazením hraničních hodnot pro stádo C (AUC = 0,86)



Tabulka 11: Hraniční hodnoty, senzitivita (Se), specificita (Sp) a míra falešné pozitivity (FP) pro stádo C

Metoda	Symbol	Hraniční hodnota	Označení	Hodnota indexu	Se	Sp	FP (%)
Euklid	D	0,09575	0,096 D Y	0,28137	0,89	0,74	26
IU	=	0,10428	0,104 =	0,02608	0,72	0,75	25
Youden	Y	0,09575	0,096 D Y	0,63039	0,89	0,74	26

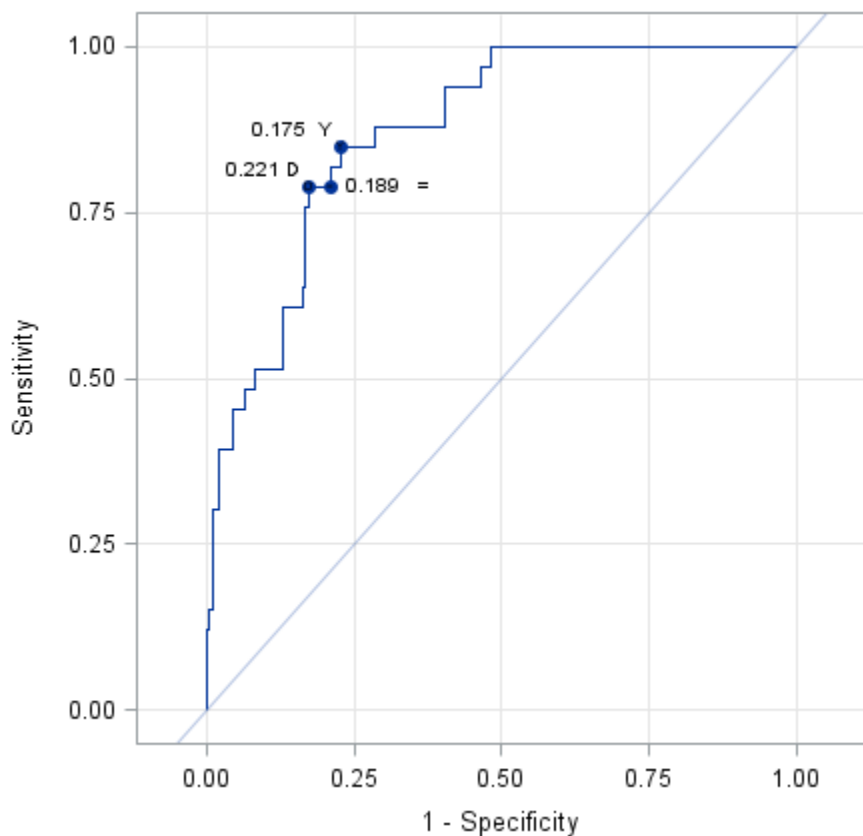
Graf 5: ROC křivka s vyobrazením hraničních hodnot pro stádo D (AUC = 0,80)



Tabulka 12: Hraniční hodnoty, senzitivita (Se), specificita (Sp) a míra falešné positivity (FP) pro stádo D

Metoda	Symbol	Hraniční hodnota	Označení	Hodnota indexu	Se	Sp	FP (%)
Euklid	D	0,23990	0,24 D Y	0,26929	0,80	0,82	18
IU	=	0,23092	0,231 =	0,00328	0,80	0,80	20
Youden	Y	0,23990	0,24 D Y	0,61967	0,80	0,82	18

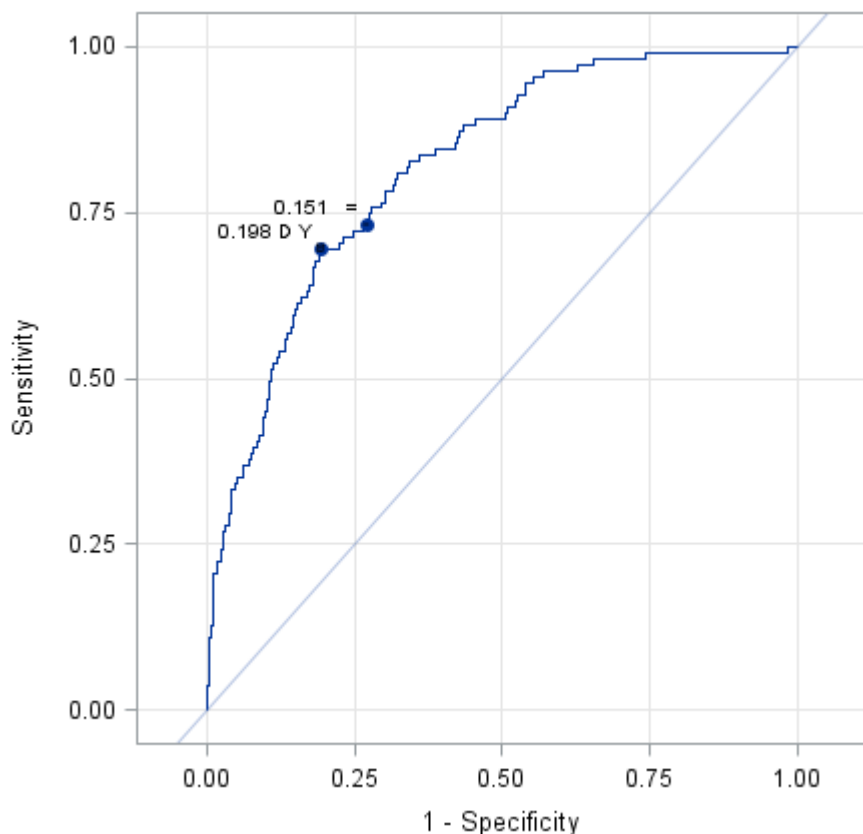
Graf 6: ROC křivka s vyobrazením hraničních hodnot pro stádo E (AUC = 0,87)



Tabulka 13: Hraniční hodnoty, senzitivita (Se), specificita (Sp) a míra falešné pozitivity (FP) pro stádo E

Metoda	Symbol	Hraniční hodnota	Označení	Hodnota indexu	Se	Sp	FP (%)
Euklid	D	0,22081	0,221 D	0,27384	0,79	0,83	17
IU	=	0,18856	0,189 =	0,00017	0,79	0,79	21
Youden	Y	0,17525	0,175 Y	0,61943	0,85	0,77	23

Graf 7: ROC křivka s vyobrazením hraničních hodnot pro všechna stáda dohromady (AUC = 0,82)



Tabulka 14: Hraniční hodnoty, senzitivita (Se), specifická (Sp) a míra falešné pozitivita (FP) pro všechna stáda dohromady

Metoda	Symbol	Hraniční hodnota	Označení	Hodnota indexu	Se	Sp	FP (%)
Euklid	D	0,19844	0,198 D Y	0,36217	0,69	0,81	19
IU	=	0,15085	0,151 =	0,00026	0,73	0,73	27
Youden	Y	0,19844	0,198 D Y	0,50046	0,69	0,81	19

Závěr

Na základě všech výše uvedených výsledků je možné konstatovat, že pro spolehlivou diagnostiku NEB u dojnic od 3 do 35 dnů laktace lze využít model logistické regrese zahrnující složky mléka. Ve všech stádech byl významným prediktorem NEB obsah C18:1. Ve čtyřech stádech z pěti posuzovaných byl signifikantní také obsah mléčného tuku. Ve třech stádech byl významný navíc také obsah C18:0. V jednom posuzovaném stádu byly signifikantními efekty obsah bílkovin a C18:1. Na základě dílčích výsledků z jednotlivých analyzovaných stád byl sestaven model pro všechna stáda dohromady, ve kterém byly významnými prediktory obsah tuku, obsah C18:1 a C18:0. Pro praktické použití byly navrženy hraniční hodnoty, které rozdělují sledované dojnice na zdravé (NEB0) a s výskytem NEB (NEB+). Jako optimální metoda stanovující hraniční hodnoty byla vybrána Index of Union, která využívá absolutní rozdíl mezi diagnostickou mírou a hodnotou AUC k minimalizaci míry chybné klasifikace. Ke každé hraniční hodnotě se váže určitá senzitivita a specifická. Pro hraniční hodnoty optimalizované metodou IU se v našem případě senzitivita pohybovala v intervalu od 0,72 do 0,83 a specifická od 0,73 do 0,83. Jinými slovy lze říci, že testy vytvořené na základě predikce ze složek mléka správně odhalí 73 až 82 % skutečně pozitivních jedinců s NEB a zároveň míra falešné pozitivita ($1 - Sp$) bude

od 17 do 27 %. Model vytvořený pro všechna stáda dohromady se rovněž vyznačuje poměrně vysokou spolehlivostí a tedy aplikovatelností v praxi, avšak kvůli relativně malému počtu pozorovaných jedinců jej nelze zatím považovat za zcela univerzální.

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Zaměření metodiky je reakcí na současnou situaci v celé řadě dojených stád, kde se dojnice v postpartálním období často dostávají do stavu NEB. Pokud je tento nežádoucí energetický stav intenzivní a dlouhodobý, dojnice čelí výrazně vyššímu riziku výskytu zdravotních poruch, reprodukčních problémů a snížené užitkovosti, což má významný negativní vliv na ekonomiku výroby mléka a welfare zvířat v daném stádu. Do popředí zájmu se proto dostává výzkum metod, kterými by bylo možné NEB u jednotlivých dojnic odhalit, a to natolik brzy, aby bylo možné efektivně zasáhnout a zabránit tak výše zmíněným nežádoucím důsledkům. Protože zjišťování koncentrace NEMK v krvi, což je metoda používaná pro identifikaci NEB jako „zlatý standard“, je v praxi nepoužitelné, jsou testovány dostupnější indikátory se silnou vazbou na aktuální energetický stav zvířete. Asociace mezi NEB a koncentrací některých MK v mléce, které mohou být snadno a s relativně nízkými náklady zjišťovány v rámci KU, byla dosud testována pouze v několika většinou zahraničních studiích. Zcela novým výsledkem popsaným v předkládané metodice je využití logistické regrese a ROC analýzy parametrů složení mléka ke stanovení hraniční hodnoty, která s přiměřenou mírou spolehlivosti odliší dojnice s vyšším rizikem přítomnosti NEB. Podobný postup dle nám dostupných informací dosud nebyl v minulosti aplikován.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je využitelná chovateli zejména holštýnskému skotu, kteří jsou zapojeni do KU. V roce 2023 bylo v České republice do KU zahrnuto 94 % z celkového počtu dojnic. Dále je metodika určena poradcům z oblasti chovu skotu a specialistům z výzkumné a akademické sféry. Hodnoty minoritních složek mléka (mimo jiné obsahy MK) je možné pro každou dojnici snadno a s vynaložením nevelkých nákladů získat v rámci KU. Pomocí postupů uvedených v metodice lze s přiměřenou mírou přesnosti včas identifikovat jedince, u nichž existuje zvýšené riziko NEB a tedy následných zdravotních poruch. Po ověření rovnic uvedených v metodice na větším množství dat bude možné uvažovat o rutinním výpočtu hodnoty NEB pro každou dojnici zapojenou do KU a o jejím zveřejnění spolu s ostatními výsledky KU.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Zdravotní problémy u dojnic způsobují významné produkční ztráty, které jsou spojeny se ztrátami ekonomickými. Dochází ke snížení užitkovosti, plodnosti nebo kvality produkce, což se projeví v nižších příjmech a vyšších nákladech chovu. Snížit ekonomickou ztrátu vyvolanou onemocněním lze včasnou detekcí nemoci a brzkým zahájením léčby. Při realizaci postupů popsaných v metodice lze snížit ztráty příjmů z prodeje mléka a snížit dodatečné veterinární náklady. Odhalením NEB u dojnic dojde k situaci, kdy bude včasná léčba zahájena u většího podílu dojnic ve stádě, více krav bude vyléčeno a méně se dostane do hluboké NEB.

Je nutné uvažovat se zvýšením výdajů na rozšířenou KU pro stanovení MK v mléce. Pokud bychom jako příklad vzali modelový chov se 100 dojnicemi, při ceně přibližně 13 Kč na jeden vzorek, resp. na jednu dojnici při jedné KU, lze odhadnout vyšší náklady na 15,6 tis. Kč na stádo a rok. Tato cena byla stanovena pro experimentální rozsah analýz a je velmi pravděpodobné, že při vyšším počtu analyzovaných vzorků by se výrazně snížila.

V modelovém stádu je uvažován výskyt NEB u 15 % dojnic (to odpovídá průměrnému výskytu v námi sledovaných stádech), tj. ve stádě by bylo v NEB v rané fázi laktace 15 dojnic. Pomocí ROC křivek lze odhalit 73 % dojnic (odpovídá senzitivitě, a jedná se tedy o 11 dojnic) s NEB, u kterých bude zahájena léčba, zatímco u zbylých dojnic s NEB tento stav odhalen není. Zároveň podle ROC křivek bude určité procento indikováno jako falešně pozitivní (1 – specifická). Podle výsledků bude falešně pozitivních léčeno v modelovém chovu 27 % dojnic (tj. 4 dojnice). Dojnicím s podezřením na NEB je podáván preventivní či léčebný preparát, jehož cena se může lišit podle použitého typu. Z dostupných informací o cenách těchto preparátů lze odhadnout dodatečný náklad na 400 Kč na léčenou dojnici. V modelovém stádě tak představují výdaje na léčivo dodatečný náklad 6 tis. Kč.

U 11 dojnic, které trpí NEB a jsou léčeny se včasným podáním léčiva zabrání propuknutí dalších onemocnění, které s NEB úzce souvisejí, čímž se eliminují ztráty produkční i ekonomické. Pokud by dojnice nebyly včas zaléčeny, je vysoké riziko výskytu zdravotních poruch, jakými jsou ketóza, jaterní steatóza a různé druhy infekcí, včetně mastitid. Dle různých literárních pramenů (Kvapilík, 2014; Syrůček et al., 2024b) lze odhadovat, že v důsledku těchto onemocnění může produkce mléka poklesnout až o 500 litrů mléka na dojnici za rok a veterinární náklady narostou až o 3 %. Při současných výkupních cenách mléka cca 11 Kč za litr je možné odhadnout zvýšení tržeb z prodeje mléka v důsledku eliminace onemocnění na 5 500 Kč na vyléčenou dojnici za rok. Při aplikaci v modelovém chovu lze uvažovat s eliminací ekonomické ztráty 60,5 tis. Kč za rok. Eliminace nadbytečných veterinárních nákladů z důvodu neléčení krav by představovala při průměrných veterinárních nákladech 4 037 Kč na krávu a rok (za rok 2023, Syrůček et al., 2024a) nižší náklady o 121 Kč na vyléčenou dojnici za rok, resp. o 1,3 tis. Kč ve stádě za rok.

Dle výše uvedeného je nutné v chovu kalkulovat se zvýšenými náklady na rozšířenou KU a s dodatečnými náklady na léčení, avšak přínosem je eliminace nižších příjmů z prodeje mléka a vyšších veterinárních nákladů. Celkově lze ekonomický přínos odhadnout u modelového chovu na 40 tis. Kč ve stádě za rok. Při realizaci opatření u 10 % populace dojených krav v ČR, tj. u cca 35,8 tis. ks. dojnic, by roční ekonomický přínos sektoru mohl být cca 14,5 mil. Kč.

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Dušek, L., Pavlík, T., Jarkovský, J., Koptíková, J. 2011a. Analýza dat v neurologii: XXVII. Hodnocení diagnostických testů – vliv prevalence nemoci. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 74/107(3), 362–366.
- Dušek, L., Pavlík, T., Jarkovský, J., Koptíková, J. 2011b. Analýza dat v neurologii: XXVIII. Hodnocení diagnostických testů – křivky ROC. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 74/107(4), 493–499.
- Gerke, O., Zapf, A. 2022. Convergence Behavior of Optimal Cut-Off Points Derived from Receiver Operating Characteristics Curve Analysis: A Simulation Study. *Mathematics*. 10(22), 4206. DOI: <https://doi.org/10.3390/math10224206>
- Hajian-Tilaki, K. 2018. The choice of methods in determining the optimal cut-off value for quantitative diagnostic test evaluation. *Statistical Methods in Medical Research*. 27(8), 2374–2383.
- Hassanzad, M., Hajian-Tilaki, K. 2024. Methods of determining optimal cut-point of diagnostic biomarkers with application of clinical data in ROC analysis: an update review. *BMC Medical Research Methodology*. 24, 84. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12874-024-02198-2>
- Heirbaut, S., Jing, X. P., Stefańska, B., Pruszyńska-Oszmałek, E., Buysse, L., Lutakome, P., Zhang, M. Q., Thys, M., Vandaele, L., Fievez, V. 2023. Diagnostic milk biomarkers for predicting the metabolic health status of dairy cattle during early lactation. *Journal of Dairy Science* 106(1), 690–702.
- Hussein, H. A., Thurmann, J. P., Staufenbiel, R. 2020. 24-h variations of blood serum metabolites in high yielding dairy cows and calves. *BMC veterinary research* 16, 327. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02551-9>
- Jorjong, S., van Kneysel, A. T. M., Verwaeren, J., Val Lahoz, M., Bruckmaier, M., De Baets, B., Kemp, B., Fievez, V. 2014. Milk fatty acids as possible biomarkers to early diagnose elevated concentrations of blood plasma nonesterified fatty acids in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 97(11), 7054–7064.
- Kvapilík, J. 2014. Mastitidy dojených krav a ekonomické ztráty. *Veterinářství*. 64(12), 946–955.
- Leduc, A., Souchet, S., Gelé, M., Le Provost, F., Boutinaud, M. 2021. Effect of feed restriction on dairy cow milk production: a review. *Journal of Animal Science*. 99(7), 1–12.
- Litherland, N. B., Dann, H. M., Drackley, J. K. 2011. Prepartum nutrient intake alters palmitate metabolism by liver slices from periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 94(4), 1928–1940.
- Macrae, A. I., Burrough, E., Forrest, J., Corbishley, A., Russell, G., Shaw, D. J. 2019. Prevalence of excessive negative energy balance in commercial United Kingdom dairy herds. *The Veterinary Journal*. 248, 51–57.
- Mandrekar, J. N. 2010. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *Journal of Thoracic Oncology*. 5(9), 1315–1316.
- Mäntysaari, P., Mäntysaari E. A., Kokkonen, T., Mehtiö, T., Kajava, S., Grelet, C., Lidauer, P., Lidauer, M. H. 2019. Body and milk traits as indicators of dairy cow energy status in early lactation. *Journal of Dairy Science*. 102(9), 7904–7916.
- Nahm, F. S. 2022. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. *Korean Journal of Anesthesiology*. 75(1), 25–36.

- Ospina, P. A., Nydam, D. V., Stokol, T., Overton, T. R. 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*. 93(2), 546–554.
- Palmquist, D. L. L., Denise Beaulieu, A., Barbano, D. M. M. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science*. 76(6), 1753–1771.
- Perkins, N. J., Schisterman, E. F. 2006. The inconsistency of "optimal" cutpoints obtained using two criteria based on the receiver operating characteristic curve. *American Journal of Epidemiology*. 163(7), 670–675.
- Pires, J. A. A., Larsen, T., Leroux, C. 2022. Milk metabolites and fatty acids as noninvasive biomarkers of metabolic status and energy balance in early-lactation cows. *Journal of Dairy Science*. 105(1), 201–220.
- Roche, J. R., Bell, A. W., Overton, T. R., Loor, J. J. 2013. Nutritional management of the transition cow in the 21st century – A paradigm shift in thinking. *Animal Production Science*. 53(9), 1000–1023.
- Stoop, W. M., Bovenhuis, H., Heck, J. M. L., Van Arendonk, J. A. M. 2009. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*. 92(4), 1469–1478.
- Syrůček, J., Burdych, J., Bartoň L. 2024a. Produkční a ekonomické výsledky vybraných chovů dojených krav v roce 2023. *Náš chov*. 84(9), 49–53.
- Syrůček, J., Štolcová, M., Bartoň L. 2024b. Ekonomické důsledky onemocnění u dojeného skotu. *Náš chov*. 84(7), 50–53.
- Štolcová, M., Bartoň, L., Řehák, D. 2024. Milk components as potential indicators of energy status in early lactation Holstein dairy cows from two farms. *Animal*. 18(8), 101235. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101235>
- Štolcová, M., Bartoň, L., Syrůček, J. 2023. Možnosti včasného odhadu negativní energetické bilance u dojnic. *Náš chov*. 83(12), 22–25.
- Štolcová, M., Řehák, D., Bartoň, L., Rajmon, R. 2020. Blood biochemical parameters measured during the periparturient period in cows of Holstein and Fleckvieh breeds differing in production purpose. *Czech Journal of Animal Science*. 65(5), 172–181.
- Tyburczy, C., Lock, A. L., Dwyer, D. A., Destailats, F., Mouloungui, Z., Candy, L., Bauman, D. E. 2008. Uptake and utilization of trans octadecenoic acids in lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 91(10), 3850–3861.
- Unal, I. 2017. Defining an optimal cut-point value in ROC analysis: an alternative approach. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 3762651. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/3762651>
- Van Saun, R. J. 2016. Indicators of dairy cow transition risks: metabolic profiling revisited. *Tierärztliche Praxis Großtiere*. 44(2), 118–126.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Syrůček, J., Štolcová, M., Bartoň, L., Řehák. 2024 Milk fatty acids as potential biomarkers of negative energy balance in early-lactation dairy cows. In XXIII Middle European Buiatrics Congress. Brno: Veterinární univerzita, s. 112.

Štolcová, M., Bartoň, L. 2023. Odraz narušené energetické rovnováhy ve složení mléka. *Náš chov*. 83(9), 49–52.

Štolcová, M., Bartoň, L. 2024. Detekce negativní energetické bilance u dojnic pomocí nástrojů precizního zemědělství. *Náš chov*. 84(4), 72–74.

Štolcová, M., Bartoň, L., Řehák, D. 2024. Milk components as potential indicators of energy status in early lactation Holstein dairy cows from two farms. *Animal*. 18(8), 101235.

Štolcová, M., Bartoň, L., Syrůček, J. 2023. Možnosti včasného odhadu negativní energetické bilance u dojnic. *Náš chov*. 83(12), 22–25.

Štolcová, M., Bartoň, L., Syrůček, J. 2024 Estimation of negative energy balance using milk components with receiver operating characteristic (ROC) analysis. In XXIII Middle European Buiatrics Congress. Brno: Veterinární univerzita, s. 111.

VIII. SEZNAM ZKRATEK A POJMŮ

AUC	Area Under the Curve (plocha pod křivkou)
C14:0	kyselina myristová
C16:0	kyselina palmitová
C18:0	kyselina stearová
C18:1	kyselina oktadecenová
C18:1, <i>cis</i> -9	kyselina olejová
FN	falešná negativita
FP	falešná pozitivita
FTIR	infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací
IU	Index of Union (metoda optimalizace hraničních hodnot)
KU	kontrola mléčné užitkovosti
LCFA	mastné kyseliny s dlouhým uhlíkovým řetězcem
MCFA	mastné kyseliny se středně dlouhým uhlíkovým řetězcem
MK	mastné kyseliny
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
NEB	negativní energetická bilance
NEB+	dojnice s výskytem NEB (sérová koncentrace NEMK \geq 0,6 mmol/l)
NEBO	dojnice bez výskytu NEB (sérová koncentrace NEMK $<$ 0,6 mmol/l)
NEMK	neesterifikované mastné kyseliny
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
ROC	Receiver Operating Characteristic (analýza umožňující posoudit vypovídací schopnost daného diagnostického kritéria v závislosti na senzitivě a specificitě)
SCFA	mastné kyseliny s krátkým uhlíkovým řetězcem
Se	senzitivita
SFA	nasycené mastné kyseliny
SN	správná negativita
Sp	specificita
SP	správná pozitivita
T:P	poměr mléčného tuku k mléčnému proteinu
TMR	směsná krmná dávka
tUFA	celkové nenasycené mastné kyseliny

IX. SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Tabulka 1: Charakteristika stád zařazených do experimentů.....	6
Tabulka 2: Analyzované parametry z krve a mléka	7
Tabulka 3: Rozdíly mezi stády v koncentraci sérových NEMK, nádoji a složkách mléka u dojnic od 3. do 35. dne laktace (průměr odhadnutý metodou nejmenších čtverců)	9
Tabulka 4: Rozdíly v sérové koncentraci NEMK, denním nádoji a složkách mléka mezi skupinami dojnic podle výskytu NEB ve všech stádech dohromady	11
Tabulka 5: Vstupní data diagnostického testu: 2 × 2 tabulka četností.....	12
Tabulka 6: Základní vyhodnocení diagnostického testu.....	12
Tabulka 7: Výsledné modely a plocha pod křivkou (AUC) pro jednotlivá stáda i pro soubor všech stád dohromady	13
Tabulka 8: Hraniční hodnoty zjištěné metodou Index of Union (IU), senzitivita, specificita a míra falešné positivity pro jednotlivá stáda i pro soubor všech stád dohromady	15
Tabulka 9: Hraniční hodnoty, senzitivita (Se), specificita (Sp) a míra falešné positivity (FP) pro stádo A.....	16
Tabulka 10: Hraniční hodnoty, senzitivita (Se), specificita (Sp) a míra falešné positivity (FP) pro stádo B.....	17
Tabulka 11: Hraniční hodnoty, senzitivita (Se), specificita (Sp) a míra falešné positivity (FP) pro stádo C.....	18
Tabulka 12: Hraniční hodnoty, senzitivita (Se), specificita (Sp) a míra falešné positivity (FP) pro stádo D	19
Tabulka 13: Hraniční hodnoty, senzitivita (Se), specificita (Sp) a míra falešné positivity (FP) pro stádo E.....	20
Tabulka 14: Hraniční hodnoty, senzitivita (Se), specificita (Sp) a míra falešné positivity (FP) pro všechna stáda dohromady	21
Obrázek 1: Schematické znázornění metodického postupu	8
Graf 1: Podíl dojnic NEB+ v jednotlivých chovech.....	10
Graf 2: ROC křivka s vyobrazením hraničních hodnot pro stádo A (AUC = 0,88)	16
Graf 3: ROC křivka s vyobrazením hraničních hodnot pro stádo B (AUC = 0,83)	17
Graf 4: ROC křivka s vyobrazením hraničních hodnot pro stádo C (AUC = 0,86)	18
Graf 5: ROC křivka s vyobrazením hraničních hodnot pro stádo D (AUC = 0,80)	19
Graf 6: ROC křivka s vyobrazením hraničních hodnot pro stádo E (AUC = 0,87).....	20
Graf 7: ROC křivka s vyobrazením hraničních hodnot pro všechna stáda dohromady (AUC = 0,82).....	21

Vydal: Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves

Název: ODHAD RIZIKA NARUŠENÍ ENERGETICKÉ BILANCE DOJNIC POMOCÍ MINORITNÍCH SLOŽEK
MLÉKA S VYUŽITÍM ROC ANALÝZY

Autoři: Ing. Magdaléna Štolcová, Ph.D. (60 %)
Ing. Eva Kašná, Ph.D. (15 %)
Ing. Luděk Bartoň, Ph.D. (15 %)
Ing. Jan Syrůček, Ph.D. (10 %)

ISBN: 978-80-7403-319-3

Dedikace: Metodika byla vypracována za podpory Ministerstva zemědělství v rámci řešení výzkumného projektu NAZV QK21010038.

Vydáno bez jazykové úpravy.

© Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha Uhřetěves



Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.

Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.

Přátelství 815

104 00 Praha Uhřetěves

WWW.VUZV.CZ