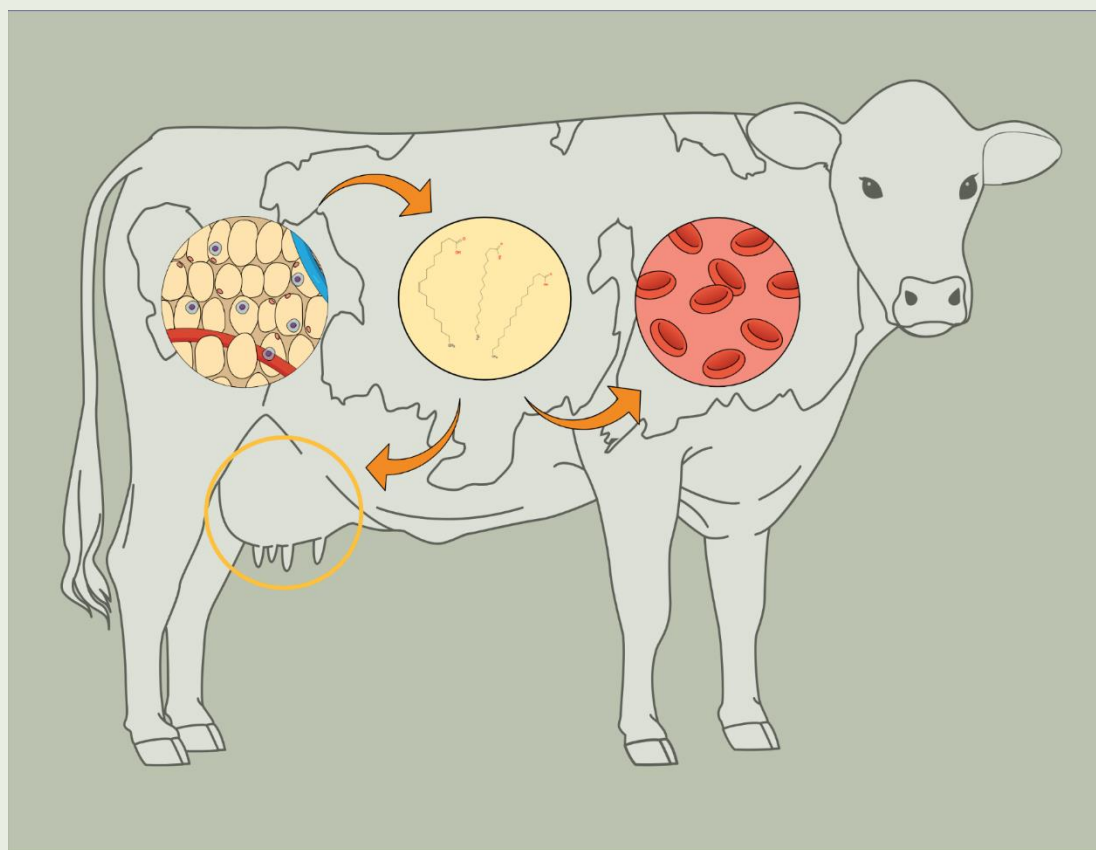


Magdaléna Štolcová a kol.

SLOŽKY MLÉKA PRO VČASNÉ ODHALENÍ NEGATIVNÍ ENERGETICKÉ BILANCE DOJNIC



ISBN: 978-80-7403-302-5

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

SLOŽKY MLÉKA PRO VČASNÉ ODHALENÍ NEGATIVNÍ ENERGETICKÉ BILANCE DOJNIC V ČASNÉ LAKTACI

Autoři

Ing. Magdaléna Štolcová, Ph.D.

Ing. Luděk Bartoň, Ph.D.

Ing. Jan Syrůček, Ph.D.

Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.

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 QK1910242.



Ministerstvo zemědělství
Těšnov 65/17
110 00 Praha 1

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

č. MZE-73188/2023-13141

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: **Složky mléka pro včasné odhalení negativní energetické bilance dojníc v časně laktaci**

Autoři: **Ing. Magdaléna Štolcová, 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: **2023**

ISBN: **978-80-7403-302-5**

Metodika byla vypracována: **v rámci výzkumného projektu NAZV č. QK1910242.**

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

18-12-2023

V Praze dne

Razítko a podpis zástupce odborného útvaru státní správy



Jméno a funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

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

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe:

v Praze dne 21.12.2023

vz. JAN RADOŠ

Mgr. Jan Radoš

Obsah

Úvod	6
I. CÍL METODIKY	7
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
Metodika experimentů a vyhodnocení dat	7
Výsledky	8
Podíl dojnic s NEB	8
Rozdíly v klíčových parametrech podle stáda	9
Rozdíly v klíčových parametrech podle NEB	11
ROC křivky pro odhad NEB	12
III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	18
IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	18
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY	19
VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	20
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	21
VIII. SEZNAM ZKRATEK A POJMŮ	22

Úvod

Negativní energetická bilance (**NEB**) je běžným a zároveň obtížně řešitelným problémem stád dojeného skotu. NEB se u dojnic objevuje nejčastěji po otelení a v první fázi laktace, kdy dojnice nejsou schopny přijmout dostatečné množství sušiny, aby byly naplněny energetické požadavky pro vysokou laktaci. Dojnice tento nedostatek energie kompenzují odbouráváním vlastní tukové tkáně. Z tukových zásob se do krevního oběhu uvolňují neesterifikované mastné kyseliny (**NEMK**), které jednak slouží jako zdroj energie a jednak jsou přímo zabudovávány do mléčného tuku. Vysoké koncentrace NEMK v krvi jsou ale pro organismus škodlivé. Při nedostatku energie nemohou NEMK dokončit kompletní přeměnu na energii a vstupují do procesu ketogeneze, při kterém se produkují ketolátky. Ketolátky na jedné straně slouží jako alternativní zdroj energie, ale pokud se jich tvoří velké množství, dochází k subklinické či klinické ketóze (Duffield et al., 2009). Nadbytečné NEMK se také v játrech přeměňují zpět na triacylglyceroly, které jsou odváděny do mimojaterních tkání. Játra mají pro tento export ale omezenou kapacitu a při jejím překročení dojde ke kumulaci triacylglycerolů v jaterních buňkách, což často vyústí v jaterní steatózu (Sejersen et al., 2012). V neposlední řadě jsou NEMK toxické pro imunitní buňky (LeBlanc, 2010), takže jsou dojnice náchylnější ke vzniku různých infekcí, především mastitid nebo metritid. Bylo také prokázáno, že vysoké koncentrace NEMK brání správnému zrání oocytů (Leroy et al., 2004), což spolu s ostatními důsledky NEB vede k poklesu reprodukční výkonnosti. Koncentraci NEMK v krevním séru lze využít pro přímý odhad NEB, přičemž jako hraniční hodnota je uváděna koncentrace vyšší než 0,6 mmol/l v prvních týdnech laktace (Van Saun, 2016). Tato laboratorní metoda je však příliš časově i finančně náročná a v chovatelské praxi proto v podstatě plošně nepoužitelná.

Nepříznivé dopady NEB na zdraví, produkci i reprodukční výkonnost dojnic vyzývají chovatele i výzkumnou sféru hledat způsoby jejího včasného odhadu. Jednou z reálných možností je vyhodnocení energetického stavu dojnice pomocí složení mléka. Na rozvoj NEB mohou poukazovat např. vysoký obsah tuku a vysoký poměr tuku a proteinu (**T:P**). Samotný T:P ale není příliš vhodným indikátorem zejména kvůli nízké specifitě, tzn. vysokému vykazování falešně pozitivních výsledků. Zvýšenou energetickou zátěž mohou indikovat také měnící se obsahy některých mastných kyselin (**MK**) mléčného tuku. V tukové tkáni dominují zejména kyselina palmitová (**C16:0**), stearová (**C18:0**) a olejová (**C18:1, cis-9**). Jak bylo popsáno výše, při NEB dochází k odbourávání tukové tkáně a tím k nárůstu koncentrace MK v krevním oběhu v podobě NEMK. Takto uvolněné MK, zejména kyselina olejová, která patří do skupiny mononenasycených MK (**MUFA**), jsou z velké míry přenášeny z krve do mléčné žlázy a jsou zabudovány do mléčného tuku (Tyburzcy et al., 2008). Lze proto předpokládat, že jejich koncentrace odráží aktuální energetický stav organismu.

Mezi základní preventivní opatření výskytu NEB patří správný management období stání na sucho, podpora přirozených mechanismů odbourávání nadbytečných NEMK (například dostatek přirozeného pohybu) a podání umělých 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 bачorem 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). V poslední době se můžeme setkat také s využitím přípravku obsahujícím antibiotikum monensin, který mění zastoupení mikrobiální populace v bачoru a zvyšuje podíl bakterií produkujících propionát.

Předkládaná metodika vychází z předchozích experimentů a jejich vyhodnocení, které byly součástí projektu NAZV QK1910242 s názvem „Složky mléka pro včasné odhalení negativní energetické bilance dojnic v časně laktaci“, a týkaly se monitoringu NEB. Původně bylo analyzováno velké množství parametrů; byl zjišťován metabolický profil z krve a analyzovány složky mléka prostřednictvím rozšířeného laboratorního

rozboru mléka, kdy kromě základních složek (tuk, protein, laktóza, sušina atd.) jsou měřeny také MK mléčného tuku. Zároveň chovy, ve kterých probíhalo sledování, byly vybaveny real-time analyzátozem, který měří základní složky mléka při každém dojení. Při počátečních experimentech byla vyhodnocena vhodnost načasování měření parametrů mléka i krve, byl vyhodnocen vliv plemene na průběh těchto parametrů (Štolcová et al., 2020, 2021a), vliv nádoje na NEB (Štolcová et al., 2023a) a v neposlední řadě byly hodnoceny rozdíly mezi ranním a večerním nádojem (Štolcová et al., 2021b) a vliv stáda (Štolcová et al., 2023b). Do finální metodiky byly díky tomu vybrány relevantní parametry dojníc v rané fázi laktace vhodné pro včasný odhad NEB.

I. CÍL METODIKY

Dojnice v NEB lze standardně identifikovat prostřednictvím měření koncentrací NEMK v krvi a jejich porovnáním s prahovou hodnotou. Tato metoda však vyžaduje opakované odběry krve a následnou finančně, organizačně i časově náročnou laboratorní analýzu, proto je v chovatelské praxi v podstatě plošně nepoužitelná. Cílem metodiky proto bylo popsat využití nepřímých indikátorů NEB, které jsou relativně snadno a bez nutnosti vynaložení vysokých nákladů dostupné, a prostřednictvím nichž lze s vysokou spolehlivostí odhalit NEB u dojníc v časně fázi laktace. Na základě vlastní experimentální práce bylo zjištěno, že vhodnými indikátory splňujícími výše popsané požadavky jsou některé složky mléka stanovené prostřednictvím rozšířeného rozboru v rámci pravidelných rozborů při provádění kontroly mléčné užitkovosti.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Metodika experimentů a vyhodnocení dat

Experimentální sledování dojníc plemene holštýnského skotu ve dvou chovech (**Stádo 1, Stádo 2**) probíhalo v období od srpna 2021 do června 2022. Obě stáda se nacházejí ve Středočeském kraji. Ve Stádě 1 je chováno přibližně 130 dojníc a ve Stádě 2 je přibližně 300 dojníc plemene holštýnského skotu. V době konání experimentu dosahovala ve Stádě 1 užitkovost 9 330 kg za normovanou laktaci a ve Stádě 2 byla užitkovost 9 870 kg. V obou stádech probíhá dojení 2× denně (3:00 a 15:00) v tandemové dojárně AfiMilk® (S. A. E., Afikim, Izrael). Nádoje z každého dojení jsou automaticky zaznamenávány pomocí dojírenského softwaru AfiFarmTM, jehož součástí je také systém AfiLab umožňující měření mléčných složek (tuk, protein a laktóza) v reálném čase (dále v textu a grafech souhrnně označeno jako **AFI**). V obou stádech se krmí 2× denně (3:00 a 15:00 se krmivo zakládá) směsnou krmnou dávkou, která je několikrát denně přihřívána automatickými přihřívacími krmiv. Dojnice v časně fázi laktace jsou krmeny stejnou krmnou dávkou založenou na kukuřičné siláži, vojtěškové senáži, seně, koncentrovaných krmivech a minerálně vitaminových doplňcích.

Do samotného experimentu bylo zařazeno celkem 369 dojníc (Stádo 1 = 176 dojníc, Stádo 2 = 193 dojníc) od 3. do 63. dne laktace. Obě stáda byla sledována vždy v rámci měsíční kontroly mléčné užitkovosti (**KU**). V den KU byly provedeny odběry krevních vzorků vždy ve stejný čas (mezi 7. – 10. hodinou). Mléko bylo odebíráno separátně z ranního a odpoledního dojení. Všechny dojnice podstoupily dvě opakovaná měření v průběhu prvních 9 týdnů laktace; první odběr mléka a krve (**odběr 1**) proběhl v období od 3. do 35. dne laktace a druhý odběr (**odběr 2**) byl proveden od 36. do 63. dne laktace.

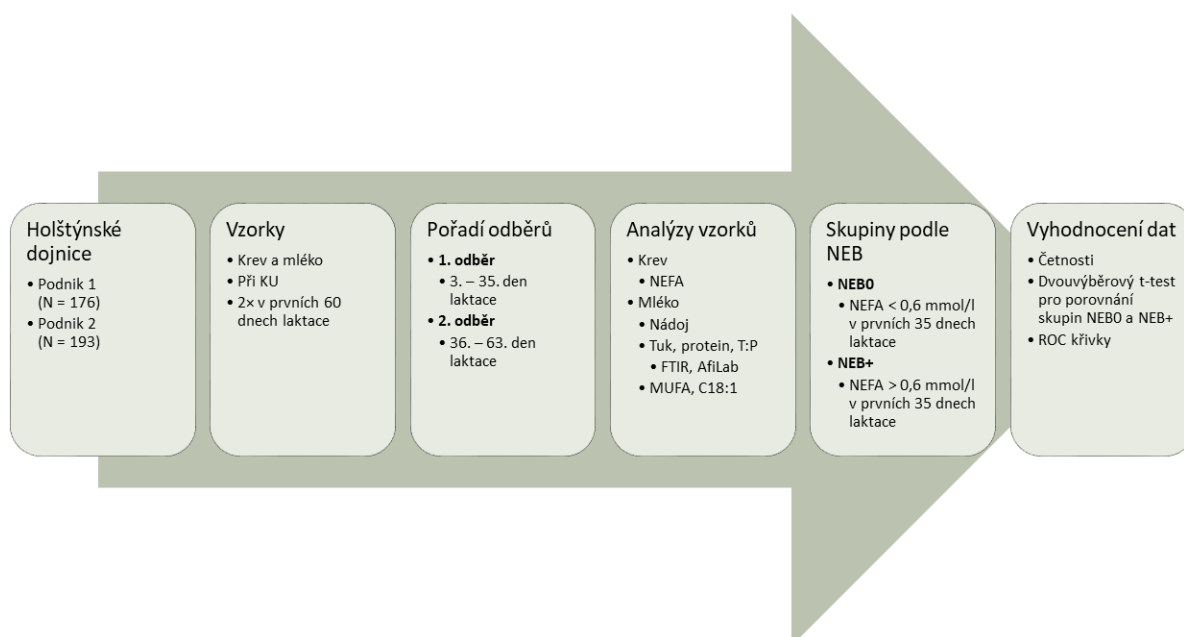
Analýza vzorků mléka probíhala v Laboratoři pro rozbor mléka v Brně při Českomoravské společnosti chovatelů a.s. metodou infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (**FTIR**). Ze základních složek byly využity obsahy tuku a proteinu a byl dopočítán T:P. Byly analyzovány také minoritní složky mléka, z nichž

na základě předchozích experimentů byly do hodnocení zařazeny MUFA a kyselina oktadecenová (**C18:1**¹), jejichž obsahy v mléčném tuku jsou klíčové pro odhad NEB. Základní složky mléka a nádoj byly zaznamenány také pomocí AFI. Všechny složky mléka byly pro účely této metodiky počítány jako denní průměr.

Ze vzorků krve byly v Klinické laboratoři pro velká zvířata při Veterinární univerzitě v Brně pomocí automatického biochemického analyzátoru měřeny koncentrace NEMK pro vyhodnocení rizik spojených s výskytem NEB. Podle úrovně NEMK byly dojnice rozděleny do dvou skupin: dojnice bez NEB (**NEBO**) a dojnice s NEB (**NEB+**), přičemž za hraniční hodnotu pro přímý odhad NEB byla považována hladina NEMK vyšší než 0,6 mmol/l (podle Van Saun, 2016) v prvních 35 dnech laktace.

Ze získaných dat byl vypočítán podíl dojnic s NEB a dále byly pomocí dvouvýběrového t-testu zjišťovány rozdíly v nádoji a složení mléka mezi skupinami NEBO a NEB+. Pro názornost vlivu NEB na složení mléka v průběhu rané laktace byly rozdíly mezi skupinami dojnic počítány zvlášť pro odběr 1 a zvlášť pro odběr 2. Pro praktické možnosti využití klíčových parametrů pro odhad NEB byly sestrojeny Receiver Operating Characteristic (**ROC**) křivky, které umožňují posoudit vypovídací schopnost daného diagnostického kritéria v závislosti na senzitivitě a specifitě. Veškeré výpočty byly prováděny pomocí softwaru IBM SPSS Statistics (version 28.0.1.0). Zjednodušené grafické znázornění metodického postupu je zobrazeno na obrázku 1.

Obrázek 1: Grafické znázornění metodického postupu



Výsledky

Výsledky jsou zaměřeny na zjištění podílu dojnic s NEB v jednotlivých podnicích (**1**) a na rozdílech sledovaných složek mléka mezi stády (**2**) a mezi dojnicemi ve skupinách NEB+ a NEBO (**3**). Prakticky nejprínosnějším výsledkem je zjištění možností diagnostiky NEB pomocí vybraných složek mléka (**4**).

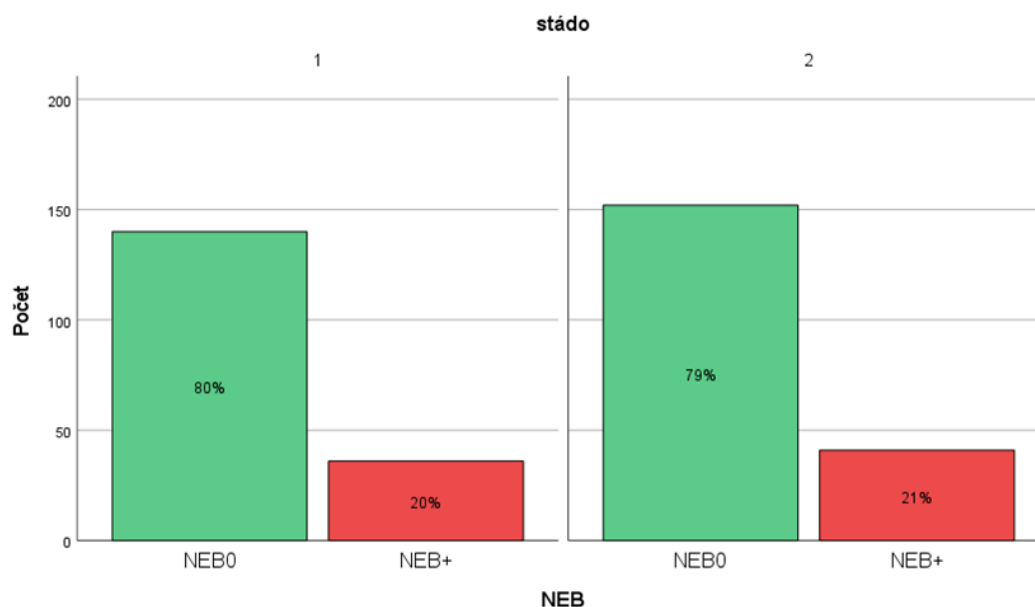
¹ V našem případě byla měřena celková C18:1, protože použitý FTIR analyzátor nedokáže separovat C18:1, *cis*-9, která však tvoří zhruba 95 % všech izomerů C18:1.

Podíl dojnic s NEB

Z celkových 369 dojnic bylo 77 NEB+; ve Stádě 1 bylo 36 dojnic NEB+ a ve Stádě 2 pak 41 dojnic. Pro přehlednost je na grafu 1 zobrazen i procentuální podíl dojnic NEB+, který byl u obou stád prakticky stejný (20 % ve stádě 1 a 21 % ve stádě 2).

K dispozici je jen málo studií, které by se v minulosti zaměřovaly na monitoring výskytu NEB u dojnic. Například ve Velké Británii, kde v letech 2006 až 2015 autoři sledovali více než 84 tisíc dojnic z 1748 farem, byl výskyt NEB u dojnic v prvních 20 dnech laktace 40 % (Macrae et al., 2019). V našich předchozích experimentech, kde byla porovnávána dvě plemena dojených krav, se NEB v prvních dvou týdnech laktace objevila u 20 % dojnic českého strakatého plemene a u 50 % holštýnských dojnic (Štolcová et al., 2021a).

Graf 1: Podíl dojnic ve skupinách NEB0 a NEB+ ve dvou sledovaných stádech



Rozdíly v klíčových parametrech podle stáda

Byly stanoveny rozdíly v denním nádoji a složkách mléka, které hrají roli v predikci NEB, přičemž základní statistické údaje jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2. Mezi stády byl zřejmý statisticky významný rozdíl v absolutních hodnotách většiny daných parametrů. Rozdíly mezi stády nebyly pozorovány v denním nádoji. Odlišné hodnoty složek mléka jsou dány zejména mezipodnikovými rozdíly v používaných krmivech a genetickém založení zvířat. Důležitější než rozdíly v absolutních hodnotách složek mléka je jejich vývoj v čase a vztah ke koncentracím NEMK v krvi. Obecně lze říct, že vývoj složek mléka v průběhu laktace je stejný bez ohledu na stádo a podobné jsou i vztahy klíčových složek mléka k NEMK v krvi.

Obsah tuku, MUFA a C18:1 se na začátku laktace v důsledku nedostatečného příjmu energie a zároveň využívání všech zdrojů pro udržení vysoké produkce zvyšuje. Zdravé dojnice brzy začnou přijímat dostatek sušiny a začnou optimálně využívat zdroje energie a obsah zmiňovaných MK postupně klesá. Obsah jiných MK (*de novo* tvořené MK s krátkým řetězcem) naopak začne růst, proto se obsah tuku jako takového v čase příliš měnit nemusí. Vztahy mezi MK a NEMK jsou dány energetickým metabolismem a čím více se odbourává rezervní tuková tkáň, tím je koncentrace NEMK v krvi vyšší, a spolu s tím narůstají také hladiny MK v mléčném tuku (Štolcová et al., 2023b).

Tabulka 1: Rozdíly ve složkách mléka ve stádě 1 a 2 v období od 3. do 35. dne laktace

Parametr	stádo	N	Průměr	SD	SEM
tuk % (Afi)	1	175	3,44 ^a	0,720	0,054
	2	190	4,09 ^b	0,937	0,068
protein % (Afi)	1	175	2,82 ^a	0,380	0,029
	2	190	3,31 ^b	0,420	0,030
tuk % (KU)	1	166	3,75 ^a	0,953	0,074
	2	192	4,26 ^b	0,797	0,058
protein % (KU)	1	166	3,32	0,335	0,026
	2	192	3,40	0,394	0,028
MUFA (g/100 g mléka)	1	166	1,09 ^a	0,333	0,026
	2	163	1,32 ^b	0,326	0,026
C18:1 (g/100 g mléka)	1	166	1,03 ^a	0,338	0,026
	2	163	1,25 ^b	0,352	0,028
T:P (Afi)	1	175	1,24 ^a	0,287	0,022
	2	190	1,28 ^b	0,425	0,031
T:P (KU)	1	166	1,13 ^a	0,268	0,021
	2	192	1,26 ^b	0,200	0,014
denní nádoj	1	176	36,4	9,465	0,714
	2	193	35,9	8,215	0,591

* SD = směrodatná odchylka, SEM = standardní chyba průměru, a, b stáda se významně liší (p < 0,001)

Tabulka 2: Rozdíly ve složkách mléka ve stádě 1 a 2 v období od 36. do 63. dne laktace

Parametry mléka	stádo	N	Průměr	SD	SEM
tuk % (Afi)	1	169	3,11	0,608	0,047
	2	193	3,24	0,709	0,051
protein % (Afi)	1	169	2,69 ^a	0,298	0,023
	2	193	3,59 ^b	0,479	0,034
tuk % (KU)	1	175	3,24 ^a	0,666	0,050
	2	193	3,50 ^b	0,502	0,036
protein % (KU)	1	175	3,13	0,252	0,019
	2	193	3,08	0,250	0,018
MUFA (g/100 g mléka)	1	175	0,87 ^a	0,169	0,013
	2	168	0,98 ^b	0,187	0,014
C18:1 (g/100 g mléka)	1	175	0,81 ^a	0,195	0,015
	2	168	0,94 ^b	0,211	0,016
T:P (Afi)	1	169	1,16 ^a	0,239	0,018
	2	193	0,94 ^b	0,317	0,023
T:P (KU)	1	175	1,03 ^a	0,201	0,015
	2	193	1,14 ^b	0,169	0,012
denní nádoj	1	176	40,9	9,650	0,727
	2	193	40,9	8,524	0,614

* SD = směrodatná odchylka, SEM = standardní chyba průměru, a, b stáda se významně liší (p < 0,001)

Rozdíly v klíčových parametrech podle NEB

V tabulkách 3 a 4 jsou zobrazeny rozdíly ve složení mléka u dojnic NEB+ a NEB0. Je patrné, že v prvních 35 dnech laktace jsou téměř všechny složky, kromě proteinu, signifikantně vyšší u dojnic NEB+. V další fázi laktace rozdíly již nebyly zaznamenány. Toto zjištění napovídá, že klíčové pro včasný odhad a prevenci NEB a jejích komplikací bude právě období prvních 5 týdnů laktace, kdy se NEB objevuje nejčastěji. Při NEB se nejprve ve zvýšené míře do krve dostávají MK původem ze zásobní tukové tkáně zvířete, které se poté stávají součástí mléčného tuku, což je příčinou rozdílů v obsahu tuku, T:P a mastných kyselin mléčného tuku mezi dojnicemi NEB+ a NEB0.

Poměrně zajímavé bylo zjištění, že rozdíly v denním nádoji mezi skupinami dojnic NEB+ a NEB0 nebyly statisticky významné, ačkoli obě stáda lze zařadit mezi vysokoprodukční. V době konání experimentu dosahovala ve Stádě 1 užitkovost 9 330 kg za normovanou laktaci a ve Stádě 2 byla užitkovost 9 870 kg. Tyto výsledky nám umožnily porovnávat dojnice bez nutnosti zohlednit rozdíly v denní dojivosti. Vysoká produkce mléka bývá ve vztahu ke vzniku NEB považována za rizikový faktor. Rizikovost vysoké produkce tkví především v tom, že vysokoužitkové dojnice mají obecně vyšší metabolickou zátěž a záleží pak spíše na každém jedinci, zda a jak se s touto zátěží dokáže jeho organismus vypořádat. Zásadní vliv na rozvoj NEB však má individuální schopnost příjmu dostatečného množství krmiva k pokrytí energetických požadavků pro vysokou laktaci.

Tabulka 3: Rozdíly ve složkách mléka u krav s NEB+ a NEB0 v období od 3. do 35. dne laktace

Parametry mléka	NEB	N	Průměr	SD	SEM
tuk % (Afi)	NEB0	288	3,64 ^a	0,80	0,05
	NEB+	77	4,28 ^b	1,08	0,12
protein % (Afi)	NEB0	288	3,09	0,49	0,03
	NEB+	77	3,03	0,40	0,05
tuk % (KU)	NEB0	285	3,87 ^a	0,85	0,05
	NEB+	73	4,63 ^b	0,89	0,10
protein % (KU)	NEB0	285	3,35	0,34	0,02
	NEB+	73	3,44	0,46	0,05
MUFA (g/100 g mléka)	NEB0	262	1,12 ^a	0,300	0,020
	NEB+	67	1,51 ^b	0,360	0,040
C18:1 (g/100 g mléka)	NEB0	262	1,06 ^a	0,320	0,020
	NEB+	67	1,46 ^b	0,360	0,040
T:P (Afi)	NEB0	288	1,21 ^a	0,33	0,02
	NEB+	77	1,44 ^b	0,43	0,05
T:P (KU)	NEB0	285	1,16 ^a	0,23	0,01
	NEB+	73	1,35 ^b	0,23	0,03
denní nádoj	NEB0	292	36,5	8,68	0,51
	NEB+	77	34,7	9,27	1,06

* SD = směrodatná odchylka, SEM = standardní chyba průměru, a, b skupiny NEB0 a NEB+ se významně liší (p < 0,001)

Tabulka 4: Rozdíly ve složkách mléka u krav s NEB+ a NEB0 v období od 36. do 63. dne laktace

Parametry mléka	NEB	N	Průměr	SD	SEM
tuk % (Afi)	NEB0	286	3,18	0,65	0,04
	NEB+	76	3,17	0,72	0,08
protein % (Afi)	NEB0	286	3,18	0,61	0,04
	NEB+	76	3,14	0,58	0,07
tuk % (KU)	NEB0	292	3,37	0,61	0,04
	NEB+	76	3,38	0,57	0,07
protein % (KU)	NEB0	292	3,12	0,25	0,01
	NEB+	76	3,03	0,26	0,03
MUFA (g/100 g mléka)	NEB0	268	0,91	0,170	0,010
	NEB+	75	0,98	0,220	0,020
C18:1 (g/100 g mléka)	NEB0	268	0,86	0,210	0,010
	NEB+	75	0,93	0,230	0,030
T:P (Afi)	NEB0	286	1,04	0,30	0,02
	NEB+	76	1,05	0,31	0,04
T:P (KU)	NEB0	292	1,08	0,19	0,01
	NEB+	76	1,12	0,20	0,02
denní nádoj	NEB0	292	40,7	8,62	0,50
	NEB+	77	41,7	10,60	1,21

* SD = směrodatná odchylka, SEM = standardní chyba průměru

ROC křivky pro odhad NEB

Pro praktické možnosti využití klíčových parametrů pro odhad NEB byly sestrojeny ROC křivky, což je grafické vyjádření, které umožňuje posoudit vypovídací schopnost daného diagnostického kritéria v závislosti na senzitivitě (pravděpodobnost správné predikce pozitivního výsledku) a specifitě (pravděpodobnost správné predikce negativního výsledku). V ideální situaci by byla senzitivita = 1, a $1 - \text{specifita} = 0$ (tzn. 0% záchyt falešně pozitivních případů). V takovém případě by model 100% správně předpovídal pozitivní i negativní případy. Jako kritérium pro hodnocení kvality (diagnostické přesnosti) ROC křivky může být použit výpočet plochy pod křivkou (Area Under Curve, **AUC**). Obecně platí, že hodnota AUC 0,5 (tj. diagonála (Reference Line)) naznačuje neschopnost diagnostikovat jedince s daným zdravotním problémem pomocí tohoto testu. Hodnoty 0,7 až 0,8 se považují za přijatelné, 0,8 až 0,9 za vynikající a více než 0,9 za prakticky dokonalé (Mandrekar, 2010). Jako další statistika je využíván Giniho koeficient ($2 \cdot \text{AUC} - 1$), jehož účelem je normalizovat hodnotu AUC tak, aby kvalita testu podobná náhodě měla hodnotu 0 a perfektní test měl hodnotu 1.

Křivky byly v případě této metodiky sestrojeny jen pro dojnice v období od 3. do 35. dne laktace, jelikož v pozdější fázi laktace již nebyly pozorovány rozdíly ve složení mléka mezi dojnicemi NEB+ a NEB0 a diagnostika by logicky selhávala. ROC analýza byla provedena jak u všech dojnic dohromady bez ohledu na stádo, tak i u dojnic pro každé stádo zvlášť. Jako diagnostické markery, které by měly nejlépe odrážet energetický stav jedince, byly vybrány T:P (jak z KU, tak i z AFI), MUFA a C18:1. Obsah tuku samotného se u dojnic ve skupině NEB+ a NEB0 také lišil, ale jeho použití v ROC analýze nevykazovalo diagnostický potenciál, proto s ním dále nebylo počítáno.

ROC křivka a odhad NEB pro dojnice z obou stád dohromady

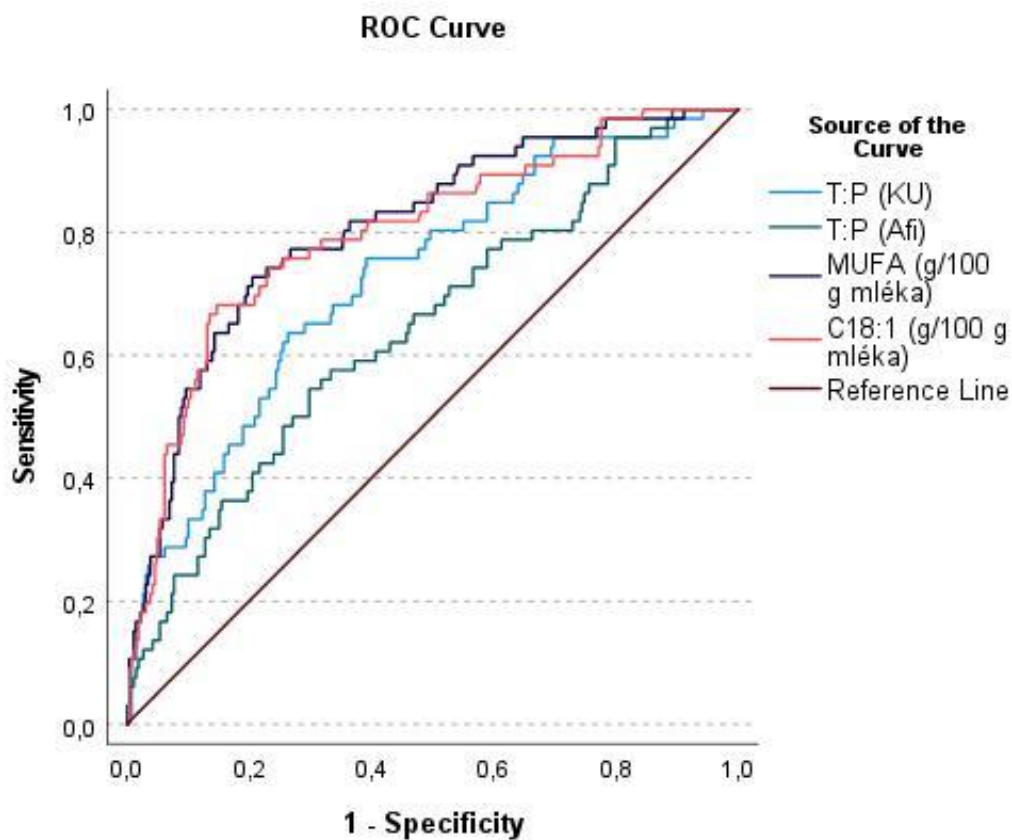
Na grafu 2 je vidět ROC křivka sestavená pro všechny dojnice bez ohledu na stádo ($N_{NEB+} = 66$, $N_{NEB0} = 258$, $N_{missing}^2 = 45$). V tabulce 5 jsou výsledky ROC analýzy, z nichž vyplývá, že T:P z AFI není příliš vhodným ukazatelem pro diagnostiku NEB (AUC = 0,6 a Giniho koeficient = 0,3). O něco lépe je na tom T:P z klasického laboratorního rozboru mléka při KU, který je podle kritérií ROC analýzy (AUC = 0,7) přijatelným indikátorem. 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. 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 T:P může být také v mléce s normálním obsahem tuku a nízkým obsahem bílkovin, a pak je problém potřeba hledat ve výživě dojnic.

Za vynikající diagnostické markery lze považovat MUFA a C18:1 (AUC $\geq 0,8$, Giniho koeficient $\geq 0,6$). Kromě zjištění vhodnosti jednotlivých složek mléka pro odhad NEB, lze pomocí souřadnic ROC³ křivek stanovit také hraniční hodnoty (**cut-off**) indikátoru, což je hlavní způsob jejich využití pro praxi. Stanovovat hraniční hodnoty má smysl pouze u ukazatelů, které mají AUC $\geq 0,8$. Z ROC křivky na grafu 2 a tabulky 5 tedy vyplývá, že pokud bychom chtěli v praxi dosáhnout odhalení 80 % dojnic NEB+ za pomoci MUFA (tj. 80% senzitivita), bude to za cenu, že 36 % případů bude falešně pozitivních (model je označí jako NEB+ pozitivní, ale ve skutečnosti budou tyto dojnice zdravé, tj. specifita = 64 %). Pokud bychom využili C18:1, tak pro 80% senzitivitu bude platit 62% specifita, tedy že 38 % dojnic bude falešně pozitivních NEB+. Hraniční hodnoty, které by bylo možné použít pro 80% záchyt NEB, jsou v případě MUFA $\geq 1,20$ g/100 g mléka a v případě C18:1 $\geq 1,11$ g/100 g mléka. Nicméně je potřeba dodat, že absolutní hodnoty složek se v jednotlivých stádech mohou lišit, takže je obtížné tyto závěry generalizovat, dokud nebudou k dispozici data z více chovů.

² $N_{missing}$ jsou chybějící údaje – ROC analýza pracuje tak, že jakmile chybí jakákoli proměnná, tak nelze počítat dál a musí se vyřadit celý případ (dojnice).

³ souřadnice vzhledem ke svému rozsahu (MS Excel o 1200 řádcích) nejsou uvedeny

Graf 2: ROC křivka pro diagnostiku NEB pomocí parametrů z mléka u dojnic v období od 3. do 35. dne laktace pro obě stáda dohromady



Tabulka 5: AUC, Giniho koeficient, hraniční hodnoty (cut-off) pro 80 % záchyt pozitivních případů NEB a podíl falešně pozitivních případů pro jednotlivé složky mléka

Parametr	AUC	Giniho koeficient	Cut-off pro 80% záchyt případů	Podíl falešně pozitivních (%)
T:P (Afi)	0,646	0,291	1,06	66
T:P (KU)	0,727	0,454	1,16	50
C18:1 (g/100 g mléka)	0,799	0,598	1,11	38
MUFA (g/100 g mléka)	0,808	0,616	1,20	36

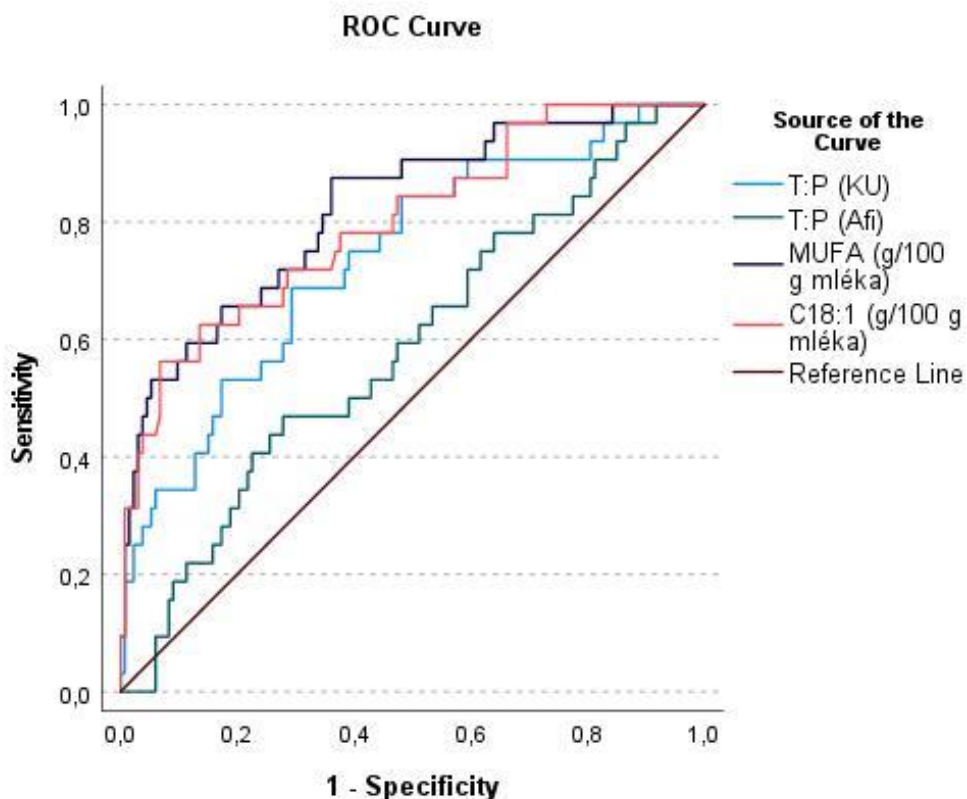
ROC křivky a odhad NEB pro dojnice z každého stáda zvlášť

Protože byly zjištěny rozdíly mezi stády, tak ROC křivky byly sestaveny také pro každé stádo zvlášť u dojnic v období od 3. do 35. dne laktace (grafy 3 a 4). Pro stádo 1 ($N_{NEB+} = 32$, $N_{NEB0} = 133$, $N_{missing} = 11$) i pro Stádo 2 ($N_{NEB+} = 34$, $N_{NEB0} = 125$, $N_{missing} = 34$) platí, že pro diagnostiku NEB jsou nejvhodnějšími parametry MUFA a C18:1 ($AUC \geq 0,8$, Giniho koeficient $\geq 0,6$).

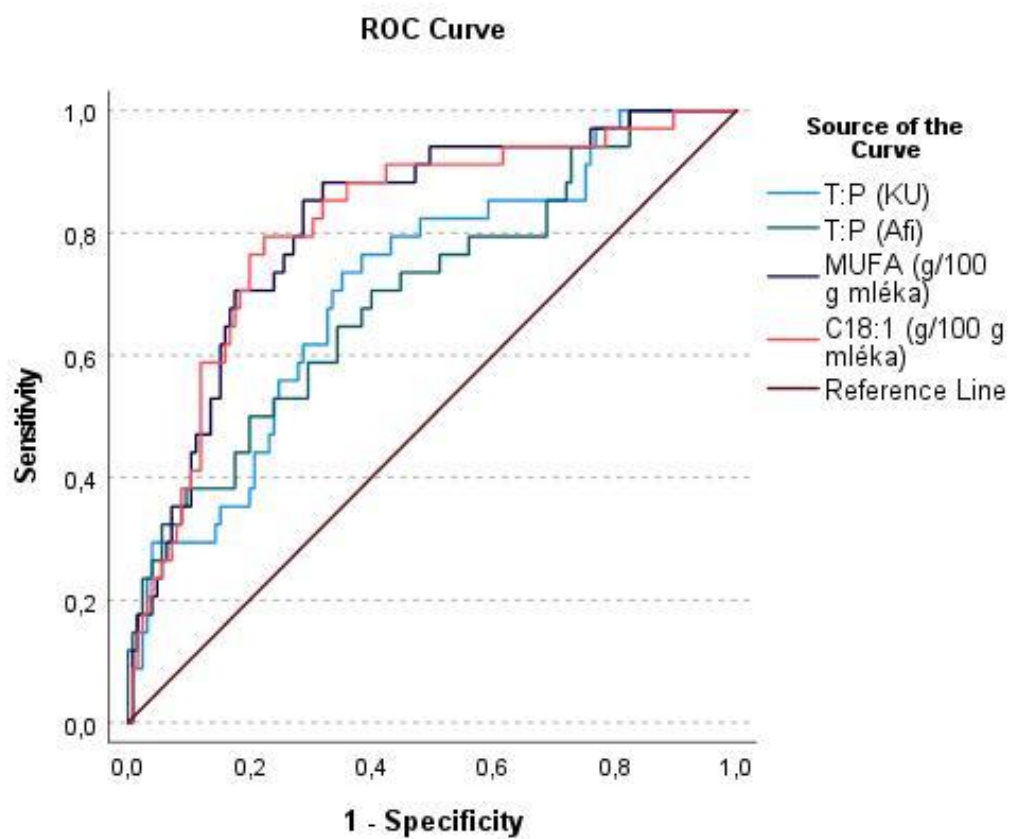
Z ROC křivky v grafu 3 a z tabulky 6 prakticky vyplývá, že pokud bychom chtěli dosáhnout ve stádě 1 odhalení 80 % dojnic NEB+ za pomoci MUFA (tj. 80% senzitivita), tak to bude za cenu, že 35 % případů bude falešně pozitivních (tj. specifická = 65 %). Pokud bychom využili C18:1, tak pro 80% senzitivitu bude platit 53% specifická, tedy že 47 % dojnic bude falešně pozitivních. Takto vysoký podíl falešně pozitivních výsledků není žádoucí, proto pro diagnostiku NEB bychom v tomto případě volili pouze MUFA. Hraniční hodnoty, které by chovatel použil pro 80% záchyt NEB, jsou v případě MUFA $\geq 1,09$ g/100 g.

Ve stádě 2 (graf 4 a tabulka 6) byla situace poněkud příznivější a lze pro diagnostiku NEB využít MUFA i C18:1. Pokud bychom chtěli ve stádě dosáhnout odhalení 80 % dojnic NEB+ za pomoci MUFA (tj. 80% senzitivita), tak to bude za cenu, že 29 % případů bude falešně pozitivních (tj. specifická = 71 %). Pokud bychom využili C18:1, tak pro 80% senzitivitu bude platit 70% specifická, tedy že 30 % dojnic bude falešně pozitivních. Hraniční hodnoty, které by chovatel použil pro 80% záchyt NEB, jsou v případě MUFA $\geq 1,35$ g/100 g a pro C18:1 $\geq 1,28$ g/100 g mléka.

Graf 3: ROC křivky pro diagnostiku NEB pomocí parametrů z mléka u krav v období od 3. do 35 dne laktace pro stádo 1



Graf 4: ROC křivky pro diagnostiku NEB pomocí parametrů z mléka u krav v období od 3. do 35 dne laktace pro stádo 2



Tabulka 6: AUC, Giniho koeficient, hraniční hodnoty (cut-off) pro 80 % záchyt pozitivních případů NEB a podíl falešně pozitivních případů pro jednotlivé diagnostické parametry a pro každé stádo zvlášť

Parametr	AUC	Giniho koeficient	Cut-off pro 80% záchyt případů	Podíl falešně pozitivních (%)
Stádo 1				
T:P (Afi)	0,587	0,173	1,05	70
T:P (KU)	0,737	0,475	1,11	48
C18:1 (g/100 g mléka)	0,798	0,597	1,00	47
MUFA (g/100 g mléka)	0,823	0,645	1,09	35
Stádo 2				
T:P (Afi)	0,700	0,401	1,0	69
T:P (KU)	0,713	0,426	1,2	48
C18:1 (g/100 g mléka)	0,812	0,625	1,28	30
MUFA (g/100 g mléka)	0,815	0,630	1,35	29

Závěr

Na základě všech výše uvedených výsledků je možné konstatovat, že pro diagnostiku NEB v prvních 35 dnech laktace lze s dobrou úspěšností využívat obsahy mléčných MUFA, a z části také C18:1, a to pro obě posuzovaná stáda dojnic plemene holštýnského skotu. Očekávaný podíl falešně pozitivních výsledků se v rámci této metodiky pohyboval od 29 do 36 % pro MUFA, a od 30 do 47 % v pro C18:1. Pro smysluplný odhad NEB se tedy jeví využití zejména obsahů MUFA. Poměrně snadno lze pomocí souřadnic ROC křivek také zjistit hraniční hodnoty pro diagnostiku NEB. V případě této metodiky po vyhodnocení výsledků dojnic z obou stád dohromady byla pro obsah MUFA zjištěna hraniční hodnota $\geq 1,20$ g/100 g a pro obsah C18:1 $\geq 1,11$ g/100 g mléka. Je nutné podotknout, že absolutní hodnoty jednotlivých složek mléka se mezi stády ve většině případů liší, proto by bylo vhodné stanovovat hraniční hodnoty vždy pro každé stádo zvlášť (nebo případně experimentálně ověřit limitní hodnoty na více stádech).

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předložená metodika je založena na znalosti a využití principů metabolických dějů u vysokoprodukčních dojnic v časně fázi laktace, kdy dochází k poměrně častému výskytu NEB. Z výsledků mnoha předchozích studií je známo, že tento energetický stav je příčinou řady zdravotních poruch s negativním dopadem na rentabilitu chovu a dobré životní podmínky zvířat. Mnohem méně je však známo o možnostech a způsobech identifikace jedinců, u kterých se NEB projevuje. Objektivní metodou, na které se shoduje většina odborníků, je odhalování výskytu NEB na základě výsledků krevních testů a zejména koncentrace NEMK. Protože však tato metoda slouží zejména pro experimentální účely a v chovatelské praxi je v podstatě nepoužitelná, je třeba hledat snadněji dostupné indikátory, pomocí kterých lze – byť nepřímo – NEB odhalit. Tato metodika využívá změn v obsahu některých složek mléka, zejména MK, u dojnic NEB+, což bylo dosud předmětem pouze několika zahraničních studií, které byly realizovány u dojnic chovaných v jiných produkčních podmínkách, než je běžné v ČR. Získávání informací o koncentracích MK prostřednictvím rozšířeného rozboru mléka v akreditované laboratoři pro rozbor mléka v rámci KU je pak spolu s využitím ROC křivek (senzitivity a specificity) a následnou možností stanovení prahových hodnot některých MK pro podmínky konkrétního stáda zcela nový koncept, který dosud v ČR nebyl uplatněn.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je určena chovatelům zejména holštýnských dojnic a poradcům v oblasti chovu skotu, kterým poskytne základní i nové informace o NEB a možnostech jejího včasného odhalení. Své uplatnění najde zejména ve vysokoužitkových chovech, kde jsou problémy s NEB v současnosti poměrně častým jevem. Aplikace v metodice uvedených postupů umožní uživatelům včasnou a jednoduchou diagnostiku NEB pomocí vybraných složek mléka, jejichž analýza probíhá přímo při KU a je tak snadno a s malými náklady dostupná pro všechny chovy do této kontroly zapojené. Včasná prevence či léčba NEB zamezí dalšímu prohlubování NEB a tím i vzniku zdravotních problémů, jakými jsou ketóza, jaterní steatóza a vyšší rizika infekcí mléčné žlázy či reprodukčních orgánů, které s NEB úzce souvisejí. Dlouhotrvající a hluboká NEB a související onemocnění vedou také k výrazným problémům s produkcí a reprodukcí, což se negativně promítne do celkové rentability stád. Efektivnějším vyhledáním a včasnou léčbou NEB lze tak očekávat snížení celkových nákladů ve stádech dojného skotu.

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Realizací v metodice popsaných opatření vedoucích k včasnému odhalení NEB u dojnic dojde k situaci, kdy bude včasná léčba zahájena u většího podílu dojnic ve stádě a do určité míry se tedy zvýší veterinární náklady. Dále je nutné započítat i náklady na rozšířenou KU. Zároveň se však méně dojnic dostane do hluboké NEB, což se projeví v nižším výskytu závažných zdravotních poruch a výrazně tak budou redukovány produkční i ekonomické ztráty.

V chovu dojnic je zapotřebí počítat s náklady na rozšířenou KU pro stanovení MK v mléce, které v současnosti činí přibližně 13 Kč na jeden vzorek, resp. na jednu dojnici při jedné KU. Pomocí ROC křivek (obsahu MUFA v mléce) lze odhalit 80 % dojnic s NEB (senzitivita), u kterých bude zahájena léčba, zatímco u zbylých 20 % dojnic s NEB tento stav odhalen není. Incidence NEB bývá průměrně 20 až 50 % z celkového počtu dojnic, v našem modelu proto uvažujeme se střední hodnotou, tj. s 35 % dojnic NEB+. Zároveň podle uvedených ROC křivek bude určité procento indikováno jako falešně pozitivní. Podle výsledků se tento podíl pohyboval mezi 29 až 36 %. Ve stádě o velikosti 340 dojených krav (tj. průměrný počet dojnic ve stádě zapojeného v ČR do KU) budou činit náklady na rozšířenou KU (stanovení MK) přibližně 53 tis. Kč za rok. Ve stejném stádě se NEB vyskytne u 119 dojnic (35 %) a 134 až 149 dojnic bude léčeno. Z těchto dojnic bude 95 skutečně NEB+ (80 % ze 119) a zbylých 39 až 54 dojnic (29 % ze 134, resp. 36 % ze 149) bude falešně pozitivních, tj. budou léčeny i přesto, že jsou zdravé.

Dojnicím s podezřením na NEB je podáváno léčivo či krmný doplněk, jehož cena se může lišit podle použitého typu. Z dostupných informací o cenách léčiv a doplňků lze odhadnout dodatečný náklad na 400 Kč na léčenou dojnici, což v modelovém stádě představuje zvýšení ročních nákladů o 54 až 60 tis. Kč. Společně s náklady na rozšířenou KU lze tedy uvažovat s vyššími ročními náklady o 107 až 113 tis. Kč, což v přepočtu znamená o 315 až 332 Kč vyšší veterinární náklady na jednu dojnici základního stáda za rok.

U 95 dojnic se však včasným podáním léčiva zabránilo propuknutí dalších onemocnění, které s NEB úzce souvisí, čímž se eliminují produkční a tím i ekonomické ztráty. Pokud by dojnice nebyly včas залéčeny, je vysoké riziko výskytu zdravotních poruch, jakými jsou ketóza, jaterní steatóza a různé druhy infekcí, včetně mastitid. Dle různých literárních pramenů (např. Kvapilík, 2014) 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 10 Kč za litr je možné odhadnout zvýšení tržeb z prodeje mléka v důsledku eliminace onemocnění na 5 000 Kč na vyléčenou dojnici za rok, resp. na 475 tis. Kč na stádo a rok. Eliminace nadbytečných veterinárních nákladů z důvodu neléčení dojnic by představovalo při průměrných veterinárních nákladech 3 838 Kč na dojnici a rok (za rok 2022, Syrůček et al., 2023) nižší náklady o 115 Kč na vyléčenou dojnici za rok, resp. o 11 tis. Kč ve stádě za rok.

Celkově lze ekonomický přínos realizovaných opatření v jednom chovu s průměrným počtem 340 dojených krav základního stáda dle výše uvedených výpočtů odhadnout na 373 až 379 tis. Kč. Při realizaci opatření u 50 průměrných zemědělských podniků s chovem dojeného skotu (17 tis. kusů dojených krav, tj. cca 5 % populace dojených krav v ČR) by roční ekonomický přínos mohl být cca 19 mil. Kč.

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Duffield, T. F., Lissemore, K. D., McBride, B. W., Leslie, K. E. 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science*. 92(2), 571–580.

Kvapilík, J. 2014. Mastitidy dojených krav a ekonomické ztráty. *Veterinářství*. 64(12), 946–955.

LeBlanc, S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development*. 56(Supplement), S29–S35.

Leroy, J. L., Vanholder, T., Delanghe, J. R., Opsomer, G., Van Soom, A., Bols, P. E. J., Dewulf, J., De Kruif, A. 2004. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. *Theriogenology*. 62, 1131–1143.

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.

Sejersen, H., Sørensen, M. T., Larsen, T., Bendixen, E., Ingvarsen, K. L. 2012. Liver protein expression in dairy cows with high liver triglycerides in early lactation. *Journal of dairy science*. 95(5), 2409–2421.

Syrůček, J., Burdych, J., Bartoň, L. 2023. Produkční a ekonomické ukazatele podniků s chovem dojeného skotu 2022. *Náš chov*. 83(8), 28–32.

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.

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

Štolcová, M., Bartoň, L. 2022. Mléko jako indikátor poruch zdravotního stavu dojnic. *Náš chov*. 82(12), 24–27.

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

Štolcová, M., Bartoň, L., Řehák, D. 2023b. Milk traits as indicators of energy status in early lactation dairy cows from two farms. In *Book of Abstracts of the 1st Regional Meeting of the European Federation of Animal Science*. Nitra, Slovakia: Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovakia, s. 52.

Štolcová, M., Řehák, D., Bartoň, L. 2021a. Changes in milk ketone and fatty acid concentrations during early lactation in Holstein and Fleckvieh cows. *Czech Journal of Animal Science*. 66(12), 477–486.

Štolcová, M., Řehák, D., Bartoň, L. 2021b. Vliv času dojení a týdne laktace na variabilitu nadoje a složení mléka u dojnic v časně laktaci. *Mlékařské listy*. 32(6), 33–39.

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.

VIII. SEZNAM ZKRATEK A POJMŮ

AFI	dojírenský softwar AfiFarm™, jehož součástí je také systém AfiLab pro měření složek mléka
AUC	Area Under Curve (plocha pod křivkou)
C16:0	kyselina palmitová
C18:0	kyselina stearová
C18:1	kyselina oktadecenová
C18:1, <i>cis</i> -9	kyselina olejová
cut-off	hraniční hodnota indikátoru pro diagnostiku
FTIR	infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací
klíčové parametry	obsahy MUFA a C18:1 v mléčném tuku, které jsou klíčové pro určení NEB
KU	kontrola mléčné užitkovosti
MK	mastné kyseliny
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
NEB	negativní energetická bilance
NEB+	dojnice s výskytem NEB (koncentrace NEMK $\geq 0,6$ mmol/l)
NEBO	dojnice bez výskytu NEB (sérová koncentrace NEMK $< 0,6$ mmol/l)
NEMK	neesterifikované mastné kyseliny
ROC	Receiver Operating Characteristic (analýza umožňující posoudit vypovídací schopnost daného diagnostického kritéria v závislosti na senzitivitě a specificitě)
T:P	poměr mléčného tuku k mléčnému proteinu

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

Název: SLOŽKY MLÉKA PRO VČASNÉ ODHALENÍ NEGATIVNÍ ENERGETICKÉ BILANCE DOJNIC V ČASNÉ LAKTACI

Autoři: Ing. Magdaléna Štolcová, Ph.D. (70 %)
Ing. Luděk Bartoň, Ph.D. (20 %)
Ing. Jan Syrůček, Ph.D. (10 %)

Oponenti: Ing. Vojtěch Zink, Ph.D.
FARMCZSYSTEM, s. r. o.

Ing. Jan Vodička, Ph.D.
Odbor živočišných komodit a ochrany zvířat, Ministerstvo zemědělství

ISBN: 978-80-7403-302-5

Dedikace: Metodika byla vypracována za podpory Ministerstva zemědělství v rámci řešení výzkumného projektu NAZV QK1910242.

Vydáno bez jazykové úpravy.

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

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

www.vuzv.cz