



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ



Vybrané mastitidní ukazatele jako příznaky podezření na neoprávněné snížení počtu somatických buněk v syrovém kravském mléce

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

Zpracovali:

Oto Hanuš, Hana Nejeschlebová, Marcela Klimešová,
Jaroslav Kopecký, Radoslava Jedelská, Ludmila Nejeschlebová

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

ISBN: 978-80-88390-14-5

Prosinec 2025

Vydavatel:

Pro: Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Vydal: MILCOM a.s., Ke Dvoru 12a, Praha 6, 16000

Místo vydání:

Praha

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF.

Zveřejněno na webové stránce:

<https://agronavigator.cz/metodiky/potravinarstvi>

Pořadí vydání:

1. vydání, 2025

Podíl autorů na tvorbě metodiky:

40 % Oto Hanuš
20 % Hana Nejeschlebová
10 % Marcela Klimešová
10 % Jaroslav Kopecký
10 % Radoslava Jedelská
10 % Ludmila Nejeschlebová

Podíl firem na tvorbě metodiky:

100 % Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

Podíl projektů na tvorbě metodiky:

100 % QK21010212

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

- 1) **Odborník z daného oboru:** Ing. Vladimír Čejna Ph.D., pracoviště: Savencia Fromage & Dairy, a.s., potravinářský odborník a technolog (kvalita mléka, sýrařství), vývoj potravinových mléčných specialit
- 2) **Pracovník státní správy:** MVDr. Jana Hornáčková, pracoviště: Státní veterinární správa, Praha – odborník kontroly zdravotních, hygienických a kvalitativních faktorů v potravinářství

Dedikace na projekt:

Metodika je výsledkem řešení:

Výzkumného projektu č. QK21010212 s názvem: „Vývoj metod pro kontrolu manipulace kvality mléka určeného k dalšímu technologickému zpracování a zajištění jeho autenticity“, jako výsledek QK21010212-V10

Obsah

Cíl metodiky.....	2
Nejčastěji použité zkratky:	2
Vlastní popis metodiky.....	3
1) Úvod – literární podklady a současná situace	3
2) Cíl metodiky vývoje a validace postupu pro detekci rizika použití technologie ARPSB v mlékařské praxi	9
3) Vlastní metodika pro posouzení potenciálu hodnot laktoferinu a PSB v mléce k detekci ARPSB	9
Materiál a metody.....	9
Výsledky a diskuse.....	11
4) Závěr metodiky pro odhad rizika ARPSB	23
Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice	24
Popis uplatnění metodiky.....	25
Ekonomické aspekty.	25
Seznam použité související literatury.....	26
Seznam publikací, které předcházely metodice.	29
Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech:	29
Předchozí tematicky relevantní metodiky k problematice stanovení laktoferinu a některých způsobů detekce falšování mléka:	31

Cíl metodiky.

Cílem metodiky je podpora kontrolních metod a zajištění a zvýšení věrohodnosti výsledků a provozní jistoty managementu rutinních analytických laboratoří v systému kontroly kvality mléka (KKM; bazénové vzorky mléka – podpora kvality a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce) prostřednictvím návrhu modelu aproximační detekce umělé redukce počtu somatických buněk.

Nejčastěji použité zkratky:

AKM = aktivní kyselost mléka;

ARPSB = umělé redukce počtu somatických buněk;

BMM = bod mraznutí mléka;

BVM = bazénový vzorek mléka;

CF nebo C = České strakaté;

ČR = Česká republika;

EU = Evropská Unie;

FC = průtočná cytometrie (flow cytometry);

H = Holštýn;

HB = obsah hrubých bílkovin;

IVM = individuální vzorek mléka;

KAS = obsah kaseinu;

KC = koncentrace kyseliny citronové;

KKM = kontrola kvality mléka;

KSM = kysací schopnost mléka (jogurtový test);

KU = kontrola mléčné užitkovosti;

L = obsah monohydrátu laktózy;

LF = laktoferin v mléce;

MIR-FT = technologie infračervené (IR) spektroskopie mléka s celým IR spektrem pomocí Michelsonova interferometru a s využitím Fourierových transformací;

MALDI-TOF = matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (matrix assisted laser desorption/ionization), v kombinaci s detektorem doby letu (time-of-flight);

MOC = koncentrace močoviny;

NMR = magnetické nukleární rezonance na bázi protonové hmotnostní spektroskopie;

pH = aktivní kyselost;

PKČR = Potravinářská komora České republiky;

PLS = metoda nejmenších parciálních čtverců (Partial Least Squares);

PSB (SCC) = počet somatických buněk (somatic cell count);

SCS = skóre PSB, skóre počtu somatických buněk (somatic cell score);

RIL = rezidua inhibičních látek;

STP = obsah sušiny tukuprosté;

T = obsah tuku;

TKM (SH) = titrační kyselost mléka;

VOD = vodivost (elektrická konduktivita) mléka;

VMK = obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku;

VÚM = Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha.

Vlastní popis metodiky.

1) Úvod – literární podklady a současná situace

Obecné informace ke kontrole autenticity a kvality syrového mléka – legislativní základ

Od počátků průmyslového mlékařství existují určité základní a historické kvalitativní ukazatele syrového mléka, sloužící ke kontrole kvality mlékařských zpracovatelských postupů a mléčných potravin, jako výstupů. Postupně vzrůstá zájem i o rychlejší až automatizované metody měření kvality mléka, s nižšími náklady, vyšší frekvencí a tím také efektivitou a přesto s akceptovatelnou věrohodností výsledků, tedy o nepřímé metody stanovení. Nejinak je tomu i v dnešním mlékařství (KUNES et al., 2021).

Sledování a vyhodnocování kvality syrového mléka pomáhá plnit důležitou společenskou zakázku (BAUMGARTNER et al., 2000). Bezpečnost a kvalita mléčného potravinového řetězce jsou důležitými aspekty ochrany veřejného zdraví. Proto jsou výsledky kontroly kvality syrového mléka v ČR, stejně jako v dalších vyspělých mlékařských zemích, pravidelně a relativně podrobně zveřejňovány pro informovanost odborné komunity, ale i společnosti konzumentů mléčných výrobků v případě, že tato projeví zájem (KOPUNECZ, 2020; BUCEK et al., 2021; KOPÁČEK, 2023 a, b, c, d, 2024; SLÁDEK, 2024; SYRŮČEK et al., 2024).

Autenticita potravinových surovin a potravin (syrového mléka a mléčných produktů) je celosvětově předmětem zájmu a rozbíhající se kontroly. Tato činnost probíhá s nejrůznějšími aspekty, aby bylo zabráněno případným rizikovým a nežádoucím falšovacími praktikám. Falšování je obecně rozšířená lidská činnost motivovaná komerčními zájmy, vedoucí obvykle k přisouzení neadekvátní hodnoty za domnělou kvalitu. Nejinak je tomu v mlékařství. Poškozována jsou tím tedy zejména kvalitativní hlediska produkce. Pokud se jedná o studium analytického odhalování těchto praktik, naše pracoviště se zabývalo řadou ohledů již dříve (HANUŠ et al., 2012, 2015, 2019, 2020, 2021; HANUŠ, 2019; např. bodem mrznutí mléka s ohledem na zvodnění suroviny atd.), posledně ohledně odhalování falšování mléka malých přežvýkavců mlékem kravským (RYSOVÁ et al., 2021, 2022 a, b, c; KEJDOVÁ-RYSOVÁ et al., 2024). Přitom byly použity analytické metody NMR a MALDI-TOF. Určitá zkušenost pracoviště v oboru tedy již existuje.

Kvalita syrového mléka (SAMKOVÁ et al., 2012) v ČR byla dlouho (cca 25 let) upravována články českého standardu ČSN 57 0529 („Syrové kravské mléko“; autor MVDr. Ivan Kadlec a kol.), která ve své době do cca roku 2 000 přispěla významně k růstu kvality (HANUŠ et al., 2019 b). Po vstupu do EU byla platnost této kvalitní normy postupně, v toku času, otupována (z komerčních důvodů mezinárodního obchodu, kdy mnohé jiné zahraniční normy nedosahovaly této náročnosti (např. v USA s ohledem na PSB)): 1) platná norma; 2) později norma platná, ale nezávazná; 3) nyní norma neplatná. Přesto, stále nachází, tato norma, vlivem odborných pracovníků, pamětníků, v mnohých ohledech svými ustanoveními své místo v současně uzavíraných, dodavatelsko-odběratelských smlouvách.

Dnes, v době absence normy ČSN 57 0529, vytvořila PKČR dobrovolný akreditační systém „Cechovních norem“, který je vnímán jako značka kvality a výrobce potravin se k plnění nenuceně zavazuje, např. z komerčních důvodů. Pro prvovýrobu mléka je tam standard „Syrové kravské mléko“ 2016-03-18-0127. Ve věci korektnosti v mlékařství dřívější normy, i tato cechovní norma, obsahují obvykle obecnou formulaci: „**Z mléka nesmí být před ošetřením v mlékárně nic odebráno a nic přidáno.**“ Znamená to tedy například zákaz používání separátorů v prvovýrobě.“ Ovšem, tato dobrovolná cechovní norma má oporu i

v evropské potravinové legislativě: Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013 ze dne 17. prosince 2013, kterým se stanoví společná organizace trhů se zemědělskými produkty:

Část III

Mléko a mléčné výrobky

1 „Mlékem“ se rozumí výhradně běžná tekutina vylučovaná mléčnou žlázou získaná z jednoho nebo více dojení bez toho, aby se do ní cokoli přidávalo nebo z ní odebíralo.

Výraz „mléko“ se však může použít:

Výše uvedené legislativně podporuje řešení projektu MZe NAZV Země QK 21010212 s ohledem na riziko výskytu ARPSB a potravinové právo.

Krátký, namátkový, historický, literární exkurz do falšování potravin a potravinových surovin, jak jej přinášel život a konečně i ve světle zákonnosti

S ohledem na potravinářství, resp. mlékařství, se můžeme např. dočíst, z doby rozpadu Rakousko-Uherské monarchie, ve známé knize „Školák Kája Mařík“, zajímavý příklad: „Mléko pomalu vychládá a Kája konečně upíjí (HÁJ, 1930). Ten pán měl pravdu, když řekl, že v Praze není takové, jako u nich, že je – a Kája si za nic nemůže vzpomenout, jak to ten pán řekl. Ale protože nerad i v myšlenkách nechával větu nedokončenou, domyslí, že je „nabryndané“, jak slýchával maminku hubovat na tetu kovářku, která si také brala Pražáky na letní byt a chlubila se, že z litru mléka z hajnovny udělá dva jako nic, a ještě se Pražáci olizují. Maminka říkala: „Je to hřích, takhle ty pány šidit, nabryndat jim vody!“ a proto přestala jí mléko prodávat“.

Historický popis aktu falšování mléka za Rakousko-Uherska a první Československé republiky zachytili také KADEČKA a ROZMAN (2006): „Při zvýšeném obchodu s mlékem a mléčnými výrobky se, pochopitelně, dostala do popředí i otázka jejich kvality Mezi prodavačkami – tímto obchodem se vesměs zabývaly ženy – se již dříve objevovaly snahy přilepšit si na úkor kupujícího. Množství mléka se dalo snadno zvýšit přidávkem vody nebo vody se solí, množství másla přimísením škrobu, mouky, bílé řepy, křídly atd. Toto jednání nebylo ovšem bez rizika. Kromě ztráty důvěry přicházelo v úvahu třeba i pranýřování. Nepoctivá obchodnice stála několik hodin na hanbě před zraky celého města, při zpřísněném trestu s máslem na hlavě. Odkaz nápravného aktu tohoto, „ kdo máš máslo na hlavě, nechod' na slunce ...“, je připomínán dodnes.

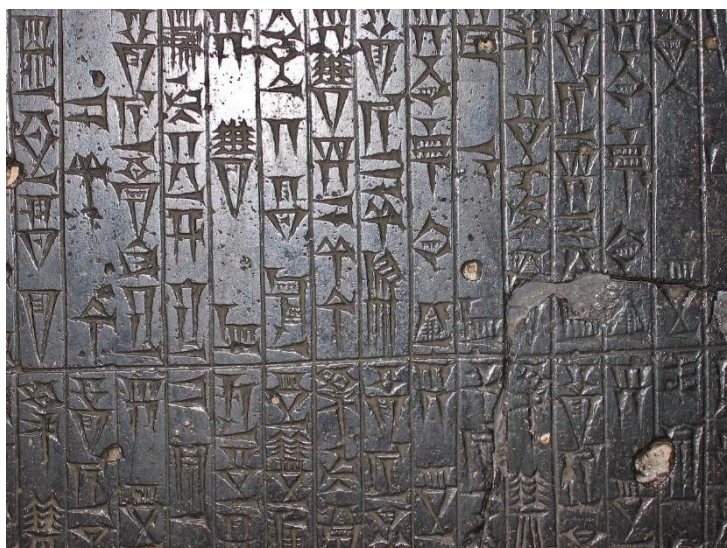
O potřebě dohlídky se píše již v roce 1859 (časopis Živa): „ Když se mléko nevyšetřuje a každá mlíkařka sama pro sebe někde za vraty sedí a mléko dle libosti bryndá, pak není ovšem divu, když se musí špatné mléko za drahé peníze kupovat..... “. Řešení se pak spatřuje ve vyčlenění společného prostoru mlíkařkám v rohu na trhu města, aby pohromadě prodávati musely: „ ... by bába dávala již jedna na druhou pozor, a tak by se mnohé bryndání předešlo ...“.“ Mimořádně, mlékařky vůbec bývaly významnými historickými osobami venkovského života, jak dokazuje jeden z nejslavnějších barokních obrazů světa, Mlékařka, od Johannese Vermeera (1632 - 1675) Obr. 1.

Obr. 1 Mlékařka, Johannes Vermeer van Delft (1632 - 1675) - Rijksmuseum, Amsterdam, The Netherlands (Wikipedie).



Exaktní, sofistikované metody kontroly zvodnění mléka byly tehdy ovšem v nedohlednu, stály teprve před svým vývojem. A to je jenom mléko! Cožpak teprve pivo! Již 1686 před naším letopočtem významný mezopotamský král a zákonodárce Chammurapi (Wikipedie), formulující své zákony dle trestní metody zvykového práva – Oko za oko, zub za zub -, z něhož později vycházelo i právo římské, v potravinové sekci uvádí: „ ... Kdo bude míchat do piva vodu, bude utopen v sudu, nebo trychtýřem bude lito do něj tak dlouho pivo, dokud nezemře ... a ... Šenkýřka, která si nechá platit čepované pivo stříbrem, místo aby přijala ječmen, bude utopena. Tentýž trest čeká šenkýřku, která prodává špatné pivo ...“. Chammurapiho zákonník je dnes začátkem výuky práva na každé právnické fakultě, neboť je považován za základ začátku psaného práva z počátku kultur a civilizací (jeden z nejstarších právních záznamů, povinné kodifikované právo, Obr. 2). Tak takový býval tedy asi význam aktu falšování potravin dříve a rovněž už i na začátku kultury, ve světle viny a trestu, ve zkráceném postřehu.

Obr. 2 Chammurapiho kodex, starověká Mezopotámie, Babylon (dnešní Irák, dolní tok Eufratu, lokalita al-Hillah, pod UNESCO od 2019 – nalezeno při vykopávkách ve starověké metropoli Súsách, Írán, 1901, nyní uloženo: Paris, Louvre), 1686 př. n. l., bazaltová stéla, 3 části, 282 článků (Wikipedie).



Artificiální redukce počtu somatických buněk (ARPSB)

Artificiální redukce počtu somatických buněk (ARPSB) je jednou z možných falšovacích praktik. Spočívá v technologickém ošetření syrového mléka separátorem (centrifugační princip) a snížení PSB, kdy se tak předstírá existence „zdravějšího“ mléka (s menší mastitidní

zátěží). ARPSB tak může realizovat možnost zvýšení podílu mastitidního mléka (subklinická mastitida) v dodávce ke zpracování pro lidskou spotřebu, což je zdravotně a eticky zcela nežádoucí. K tomu existují různá komerční technologická zařízení i s možností regulace této separace. Logicky by bylo podezřelé snížit PSB na 0. Tak se uplatňují, podle praktické potřeby, různé intenzity ošetření.

Je třeba zmínit, že tato praktika se celosvětově rozšiřuje, lze odhadovat, že zejména ve střední Evropě. Ovšem, jakékoliv přesnější informace o rozšíření jsou postrádány. Fakticky není známo téměř nic. Z osobní zkušenosti lze uvést dvě sporné dodavatelsko-odběratelské situace v našem kraji za 10 let. Nicméně, řada mlékárenských odborníků tvrdí, že jev je mnohem častější. Nelze ani do budoucna logicky předpokládat, že by kdy existovala nějaká přesnější oficiální statistika, z principu věci samé. Proto ze strany mlékáren vzrostl zřetelně zájem o zisk nějaké identifikační metody pro podchycení ARPSB. Doposud ovšem žádná spolehlivější metoda není známa. To je důvodem existence projektu MZe NAZV ZEMĚ QK 21010212.

Ze zdravotního hlediska je jev nežádoucí pro vyšší frekvenci výskytu patogenů mastitid v sublinicky mastitidním mléce, které ARPSB nijak neeliminuje. Tyto jsou pak sice podle zákona eliminovány povinnou pasterací syrového mléka, ale je zde také riziko výskytu zdravotně-dieteticky rizikových a i termorezistentních enterotoxinů. Ty mohou pocházet od četných druhů patogenů (*Staphylococcus aureus*, *St. haemolyticus*, *Streptococcus uberis*, *Str. dysgalactiae*, *Escherichia coli*, atd., až 10 hospodářsky významných a cca 100 možných mikrobiálních druhů).

Hypotézy a okruhy projektu zaměřeného na analytickou detekci ARPSB

V projektu existují, s ohledem na prověřované mlékařské analytické metody pro potenciál k identifikaci ARPSB, základní experimentální hypotézy v 5 okruzích (Tab. 1).

Tab. 1 Metodické okruhy analýz vzorků bez (původní mléko a s ARPSB), pro které jsou nastaveny pokusné hypotézy.

Metodické okruhy analýz mléka bez a s ARPSB s nastavením pokusné hypotézy pro potenciál k identifikaci ARPSB:
– odhad potenciálu identifikace ARPSB pomocí výsledků enzymatických metod (semikvantitativní testy aktivit - kataláza, esteráza, laktátdehydrogenáza – zatím nepotvrzena výzkumná hypotéza) a hodnot laktoferinu v mléce;
– odhad potenciálu identifikace ARPSB pomocí výsledků průtočné cytometrie (FC) PSB, hypotéza o vlivu ARPSB na průměrnou velikost somatických buněk a tvar frekvenční distribuce PSB;
– odhad potenciálu identifikace ARPSB pomocí výsledků spekter infračervené spektroskopie (MIR-FT), hypotéza o vlivu ARPSB na spektrální charakteristiky;
– odhad potenciálu identifikace ARPSB pomocí výsledků metody NMR (hmotnostní magnetická rezonance), hypotéza o vlivu ARPSB na charakteristiky NMR;
– odhad potenciálu identifikace ARPSB pomocí výsledků metody MALDI-TOF, hypotéza o vlivu ARPSB na charakteristiky MALDI-TOF.

Hypotéza enzymatická – a laktoferin

Pro okruh enzymatických testů byla předpokládána pro identifikaci ARPSB kombinace hodnoty aktivity enzymu v mléce s hodnotou PSB (Tab. 2).

Tab. 2 Hypotéza hledání metody identifikace ARPSB – pro enzymatické testy.

Faktory hypotézy hledání metody identifikace ARPSB enzymatickými testy:
– testy pro: kataláza, esteráza a laktátdehydrogenáza v mléce;
– výzkumná hypotéza: aktivita enzymů bude vysoká pro vysoké PSB a s ARPSB pro výrazný pokles PSB (cca o 50 %) nebude klesat, nebo jen minimálně (o přímou vazbu na neutrofilny) – ARPSB bude indikována „vysokou“ aktivitou enzymů (ve vybrané kombinaci) a „nízkým“ PSB (pod cca 300 tis./ml);
– hypotéza zatím převážně nepotvrzena (dosavadní výsledky, dva důvody):
• skutečně nefunguje z podstaty věci;
• funguje slabě a semikvantitativní testy jsou nedostatečně citlivé pro daný účel;
– náhodně, v průběhu pokusů, výsledky ukázaly, že stejná hypotéza může mít platnost pro případ laktoferinu v mléce ve vztahu k PSB (SCS).

Bioaktivní protein v mléce, laktoferin (FT)

Laktoferin (LF) je transportní glykoprotein, který váže železo (Fe^{3+}) v iontech do svých laloků (N a C). Proto patří k transferinům. Touto bioaktivní činností oslabuje růstové schopnosti bakterií (antibakteriální efekt). Nachází se nejen v mléce, ale i v mukózních sekretech (sliny, slzy, sekret nosní dutiny, žluč aj.) a v sekundárních granulích neutrofilních leukocytů a krevní plazmě (GIANSANTI et al., 2016). Kromě antibakteriálního efektu LF byly popsány rovněž antivirové, antifungální, imunomodulační, antiinflamatorní či antikarcinogenní účinky (NAVRÁTILOVÁ et al., 2022; NEJESCHLEBOVÁ et al., 2023). Nejvíce je zastoupen v mléce savců (mléko lidské, kozí, ovčí, bývolí, velbloudí, kobyli, oslí, myší, prasečí). Jsou naopak druhy mléka, kde zatím izolován nebyl: krysí, psí, králičí a tulení. Zralé kravské mléko obvykle obsahuje od 20 do 500 mg/l LF (CHENG et al., 2008), v kolostru se nejčastěji nachází 1 500 až 5 000 mg/l LF (MCGRATH et al., 2015). Po kolostru množství LF prudce klesá, zvyšuje se až ke konci laktace, ve starodojném mléce (GALFI et al., 2016; VALK-WEEBER et al., 2020).

Hladina LF v mléce je ovlivněna zdravotním stavem dojnice. LF, který se účastní imunitní odpovědi mléčné žlázy na mikrobiální infekci, je ve zvýšeném množství produkován v mléce dojníc postižených mastitidou. Reakce mléčné žlázy na infekci zvýšením vylučování LF do mléka je zřejmě specifická pro různé druhy patogenů (CHANETON et al., 2006). HAGIWARA et al., (2003) uvedli obsah LF u dojníc se subklinickou mastitidou od 300 do 1 300 mg/l (průměr 500 mg/l), přičemž zároveň pozorovali trend vzrůstajícího obsahu LF se zvyšujícím se skóre počtu somatických buněk (PSB). Tendenci korelace PSB skóre a obsahu LF ($r = 0,375$) zaznamenali rovněž CHENG et al. (2008). Podobně CARLSSON et al. (1989) pozorovali při klinické mastitidě záměrně vyvolané infuzí endotoxinu *Salmonella Typhimurium* nárůst obsahu LF v mléce až na 1 600 mg/l a PSB v řádech až na $10^8 \cdot ml^{-1}$. KRÓL et al., (2010) popsali významný vliv plemene na obsah LF, jako bohatší zdroj LF se ukázalo mléko simentálského skotu a skotu plemene Jersey než holštýnského skotu. Negativně je obsah LF ovlivněn množstvím denního nádoje (HARMON et al., 1975; CHENG et al., 2008).

Bovinní LF je také schválen jako bezpečná složka potravin Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA 2012) i Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA 2016), např. k využití v kosmetice a umělé mléčné kojenecké výživě, jako doplněk stravy.

2) Cíl metodiky vývoje a validace postupu pro detekci rizika použití technologie ARPSB v mlékařské praxi

Cílem metodiky je nalézt potenciál výsledků (obsah laktoferinu a počet somatických buněk v mléce) vybraných mlékařských analytických metod) pro identifikaci podezření na použití nežádoucí techniky umělé redukce počtu somatických buněk (ARPSB) v syrovém kravském mléce pro zvýšení provozní jistoty a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce

3) Vlastní metodika pro posouzení potenciálu hodnot laktoferinu a PSB v mléce k detekci ARPSB

Materiál a metody

Použité vzorky mléka

Pro validaci kalibračního modelu nepřímé metody infračervené spektroskopie (DairySpec FT) LF MIR-FT podle výsledků referenční metody LF HPLC (High Performance Liquid Chromatography) byly použity individuální vzorky mléka z kontroly mléčné užitkovosti ($n = 205$). Tyto byly odebírány v letním i zimním krmeném období ($n = 60$ a 60), ve čtyřech stádech ($n = 30$ pro jeden odběrový den, celkem $n = 120$) od krav plemene Holštýn (H) a České (CF) strakaté ($n = 60$ a 60), během 200 dnů laktace, kde byly preferovány ze 2/3 dojnice se zvýšeným počtem somatických buněk. Dále byly vzorky mléka odebírány náhodně v jednom stádě holštýnských dojnic v časně laktaci během celého kalendářního roku ($n = 91$). Bazénové vzorky mléka ve čtyřech stádech (dojnice H a CF) během celého kalendářního roku, kdy byly odebírány vzorky mléka normálního i s přídavkem mléka abnormálního (se zvýšeným počtem PSB) v poměru 1 : 1 ($n = 20$). Tyto vzorky mléka byly také použity k derivaci thresholdu LF v mléce podle PSB, resp. skóre PSB (SCS).

Pro ARPSB ($n = 66$ a 71 (56)) byly použity bazénové vzorky mléka normálního a bazénové vzorky mléka s přídavkem mléka abnormálního (individuální mléko s vyšším PSB ($> 900 \cdot 10^3 \text{ ml}^{-1}$, subklinická mastitida) od čtyř stád dojnic dvou plemen (H a CF v poměru 1 : 1) během celé kalendářní sezóny.

Artifiziální redukce počtu somatických buněk (ARPSB)

ARPSB byla prováděna ve dvou sadách vzorků: I. ve vzorcích mléka ($n = 66$) o objemu 2 litry, kde po ARPSB byl, oproti původnímu mléku, snížen obsah tuku a PSB byl snížen o cca ± 50 % (v hodnotách aritmetických průměrů); II. ve vzorcích mléka ($n = 56$) o objemu 30 litrů, kde po ARPSB byl, oproti původnímu mléku, již zachován stejný obsah tuku a PSB byl snížen o cca ± 50 % (v hodnotách aritmetických průměrů).

K modelové centrifugaci PSB (ARPSB), jako simulaci reálného technologického postupu praxe, byla použita klasická, průtočná, malá, mlékařská odstředivka (historicky typ konstrukce Alfa Laval) s talířovým bubnem. Efektivní poloměr talíře (středního disku, vzdálenost středu odstředovaného materiálu od středu rotace) činí 25 mm (průměr bubnu, resp. talíře, 100 mm), počet talířů 12, počet otáček bubnu 11 000 za minutu. Za těchto okolností byl parametr bezrozměrné relativní centrifugační síly (RCF, kolikrát je zrychlení vyvolané rotací vyšší než gravitační zrychlení Země) pro aplikovaný materiál cca $3\,500 \times g$. Na maximálním bubnovém poloměru pak cca $7\,000 \times g$.

Analýzy a analytické postupy pro vzorky mléka

Vzorky mléka byly analyzovány nepřímou metodou na složkové ukazatele a některé vlastnosti (T, HB, L, KAS, STP, MOC, VMK, KC, LF) na relevantně kalibrovaném (v 6měsíčních intervalech) a kontrolovaném (proficiency testing) infraanalyzátoru mléka metodou MIR-FT (infračervená spektroskopie ve středové oblasti infračerveného záření za podmínek využití záznamu spektra Michelsonovým interferometrem a vyhodnocení výtěžnosti signálu prostřednictvím Fourierových transformací) podle operačního manuálu. Přitom byl využit přístroj DairySpec FT (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA). Kombinované rozšířené nejistoty výsledků měření činily: $\pm 2,77$ % relativně pro tuk ($\pm 0,101$ pro původní jednotky (%)); $\pm 2,59$ % relativně pro hrubé bílkoviny ($\pm 0,085$ % pův.); $\pm 2,77$ % pro monohydrát laktózy ($\pm 0,115$ % pův.). Při kalibrační a kontrolní činnosti bylo postupováno v rámci norem: ČSN EN ISO/IEC 17025; ČSN 57 0536; ČSN 57 0530; ČSN ISO 8196-2 (570536); ČSN ISO 8196-1 (570536); ČSN ISO 8196-3 (570536).

Počet somatických buněk (PSB) v mléce byl stanoven pomocí metody průtočné cytometrie (FC) na fluoro-opto-elektronickém čítači částic Somacount 300 (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA). Kombinovaná rozšířená nejistota výsledků měření činila: $\pm 9,3$ % pro PSB ≤ 900 tis./ml. Při kalibrační a kontrolní činnosti bylo postupováno v rámci norem: ČSN EN ISO/IEC 17025; ČSN EN ISO 13366-1 (57 0531); ČSN EN ISO 13366-2 (57 0531).

Stanovení laktoferinu (LF) v mléce chromatograficky (HPLC, high performance liquid chromatography, referenční metoda) - vzorky mléka byly odstředěny (3000 otáček/15 minut/5 °C) a z povrchu byl mechanicky odebrán tuk. 50 ml takto upraveného vzorku bylo vysráženo 10% kyselinou octovou na hodnotu pH 4,6. Po odstředění byla syrovátka oddělena od kaseinu a přefiltrována přes nylonový membránový filtr (0,22 μm) do vialek pro HPLC stanovení. Vlastní stanovení bylo provedeno kapalinovým chromatografem Alliance 2695 s PDA 2996 detektorem (Waters, USA) a kolonou Poroshell 300SB-C8, 2,1 x 75 mm, 5 μm (Agilent Technologies, USA). Bylo použito gradientové eluce a průtoku mobilní fáze 1,0 ml.min⁻¹ (voda/acetónitril/kyselina trifluoroctová), teplota kolony činila 50 °C, objem nástriku byl 5 μl . Analyty byly detekovány při 205 nm. Pro sběr a vyhodnocování dat a chod kapalinového chromatografu byl použit software Empower 2 (Waters, USA).

Titrační kyselost (SH) mléka (TKM) byla měřena prostřednictvím titrace 100 ml mléka (Soxhlet-Henkel) za použití roztoku NaOH 0,25 M v prostředí indikátoru (fenolftalein) podle normy ČSN 57 0530 (ve °SH = ml \times 2,5 mmol \times l⁻¹).

Aktivní kyselost mléka (AKM = pH) byla měřena použitím pH-metru 1100L (VWR pHenomenal pH, Darmstad, Germany), který byl pravidelně před každým měřením sady vzorků kalibrován na roztoky standardních pufrů (pH 4,0 a 7,0) při 20 °C a poskytl tak referenční hodnoty pro konstrukci kalibračního modelu MIR-FT.

Bod mrznutí mléka (BMM) byl testován metodou referenčního termistorového kryoskopu (ISO 5764:2002(E), IDF 108:2002(E); STN EN ISO 5764) pomocí CryoStar Automatic (Funke-Gerber, Berlín, Německo). Zařízení bylo před každým měřením kalibrováno referenčními kalibračními standardy (Funke-Gerber) s BMM -0,408 °C a -0,557 °C, podle relevantního standardního operačního postupu.

Elektrická vodivost (vodivost; VOD) mléka byla měřena za použití konduktometru Hanna Instruments (Rumunsko) při 20 °C. Přístroj byl kalibrován příslušným solným roztokem (KCl; 10,2 mS \times cm⁻¹) pro měření každé sady vzorků mléka.

Rezidua inhibičních látek v mléce (RIL; +/- nebo N/P) byla kontrolována pomocí testu TwinSensor (KIT20) pro kontaminaci vzorků mléka betalaktamy a tetracykliny - doba inkubace 6 minut. Pro inkubaci byl použit tepelný regulátor (Heatsensor Duo) APP032 a k odečtu inkubovaných indikačních zón proužků čtečka (Readsensor 2) APP088. Test byl použit podle manuálu výrobce a podle relevantního standardního operačního postupu.

Kysací schopnost (KSM) mléka (jogurtový test) byla stanovena formou titrační kyselosti (Soxhlet-Henkel (°SH)) za použití alkalického roztoku NaOH 0,25 N (M) v prostředí indikátoru (fenolftalein) podle ČSN EN ISO 1211 (ON 57 0534). Test byl proveden s termofilní jogurtovou kulturou YC-180, 50U (Chr. Hansen, Denmark), *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, navážka 0,24 g, 150 ml pasterované mléko, teplota 43 °C, míchání 15 min., 2 ml do každého vzorku o objemu 25 ml, čas inkubace 3,5 hodiny při 43 °C.

Statistické postupy vyhodnocení

Databáze mléčných ukazatelů byla hodnocena na parametry základní statistiky v původních hodnotách (aritmetický průměr, směrodatná odchylka, variační koeficient (%), geometrický průměr). Některé vybrané ukazatele s předpokladem větší odchylky (HANUŠ et al., 2001) od normální frekvenční distribuce dat (PSB, LF) byly logaritmičsky transformovány \log_{10} (MS Excel, Microsoft, Redmond, Washington, USA).

Diference mezi průměry byly testovány párovým t-testem s vyjádřením pravděpodobnosti nulové hypotézy. Korelační koeficienty byly vypočteny prostřednictvím lineární regrese s vyjádřením statistické významnosti na konvenčních hladinách pravděpodobnosti (MS Excel, Microsoft, Redmond, Washington, USA).

Zaznamenaná spektra MIR-FT vyhodnotil s ohledem na referenční hodnoty laktoferinu pan Craig Parsons (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA) relevantním software, ve spolupráci s panem Gavinem Thompsonem (Bentley Czech s.r.o.), čímž byly získány predikční odhady LF metodou MIR-FT za použití statistické metody částečných nejmenších čtverců (PLS).

Pro derivaci thresholdu LF k identifikaci subklinické mastitidy podle SCS (varianta PSB) podle frekvenční distribuce dat (Gaussova křivka) LF HPLC byla použita transformační rovnice se základem \log_2 (z PSB na skóre PSB (SCS)) a příslušná tabulka (podle ALI a SHOOK, 1980; SHOOK, 1982; RAUBERTAS a SHOOK, 1982; RENEAU et al., 1983 a 1988; RENEAU, 1986; WIGGANS a SHOOK, 1987).

Výsledky a diskuse

Pokrok v nepřímé analýze laktoferinu (LF) v mléce

Původní kalibrace (ELISA) použitého zařízení MIR-FT byla na databázi odebraných vzorků validována stanovením LF další referenční metodou HPLC. Původní kalibrace (individuální vzorky mléka z kontroly mléčné užitkovosti) dosáhla korelačního koeficientu r (LF, ELISA \times MIR-FT, $n = 120$) 0,576 ($P < 0,001$; NEJESCHLEBOVÁ et al., 2024). Při dalším postupu bylo dosaženo lepší hodnoty 0,767 ($P < 0,001$) pro LF, HPLC \times MIR-FT, $n = 205$ (Craig Parsons, Bentley Instruments, USA). Uvedené zvýšení korelace (r) je příslibem a známkou praktické použitelnosti této analýzy, např. při podpoře indikačních a prevenčních postupů v otázce výskytu subklinických mastitid v chovech dojnic.

Nicméně, počet metodou PLS zahrnutých faktorů do kalibračního modelu (FT HPLC), pro vysvětlení variability referenčních dat, je vyšší (9) pro analytická měření k podobným účelům, což model mírně oslabuje co do efektivity (NEJESCHLEBOVÁ et al., 2024).

Vztahy laktoferinu k souběžným mléčným ukazatelům

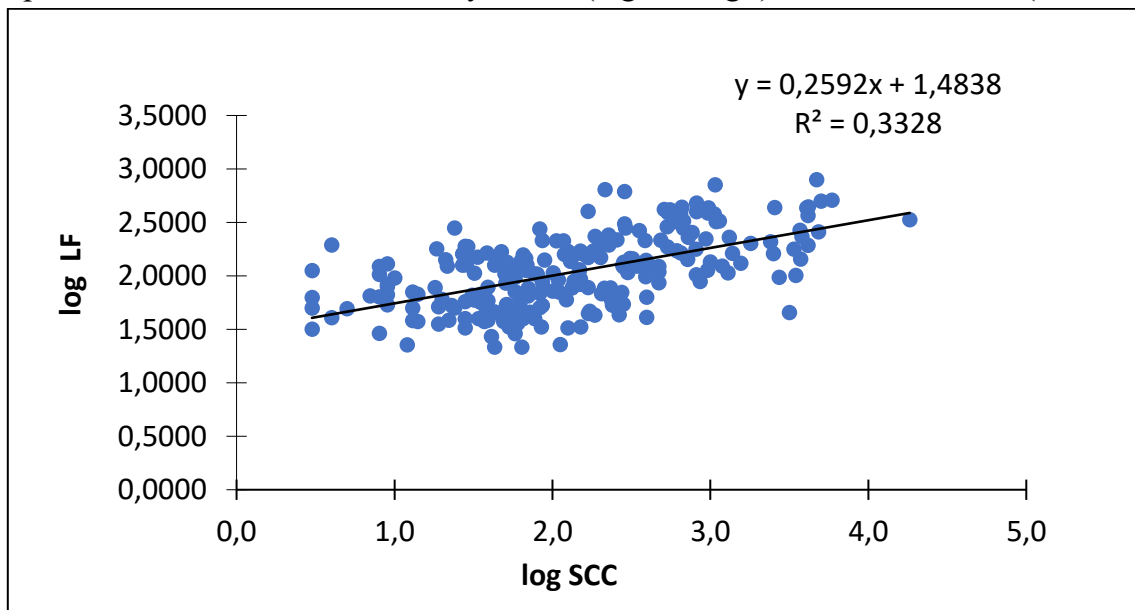
Byly stanoveny korelační koeficienty LF k ostatním mléčným ukazatelům v individuálních vzorcích mléka z kontroly užitkovosti (Tab. 3; Obr. 3). Během 200 dnů laktace (mimo mlezivové období) vykázal LF HPLC nejtěsnější vztahy (korelace) k ukazatelům souvisejícím se zdravotním stavem mléčné žlázy: - k PSB 0,529, 0,577 a 0,578 ($P < 0,001$; Tab. 3, Obr. 3); - k laktóze -0,451 ($P < 0,001$; Tab. 3). Je zřejmé (Obr. 3, log LF), že 33,3 % variability LF je dáno variacemi v PSB, resp. naopak. Proto může být LF významným ukazatelem ke zpřesnění indikace a následně i prevence subklinických mastitid během laktace (individuální vzorky v KU). Zajímavá je rovněž korelace k elektrické konduktivitě mléka, $r = 0,326$ ($P < 0,001$; Tab. 3), se stejným závěrem. Vztahy LF MIR-FT k identickým mléčným ukazatelům jsou trendově podobné, ovšem, méně těsné.

Tab. 3 Vztah LF k některým vybraným mléčným ukazatelům ($n = 120$).

	LF-HPLC	LF-MIR-FT (kal. ELISA)
Mléčný ukazatel	Pearsonův korelační koeficient	
Tuk	0,233*	0,595***
Hrubé bílkoviny	0,414***	0,808***
Kasein	0,439***	0,812***
Laktóza (monohydrát)	-0,451***	-0,265**
Celková sušina	0,215*	0,677***
Močovina	-0,316**	-0,112
Volné mastné kyseliny	0,480***	0,816***
Kyselina citronová	-0,262**	-0,383**
PSB	0,529***	0,290**
Log PSB	0,578***	0,326**
Měrná vodivost	0,326**	-0,078
Bod mrznutí mléka	-0,152	-0,366**

PSB = počet somatických buněk; LF HPLC = LF referenční metodou; LF MIR-FT = LF nepřímou metodou; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. Individuální vzorky mléka z kontroly mléčné užitkovosti.

Obr. 3 Lineární regrese mezi PSB (log SCC (PSB); tis./ml) a obsahem LF v mléce prostřednictvím referenční metody HPLC (log LF; mg/l), n = 231, r = 0,577 (P < 0,001).



Vliv ARPSB na fermentaci mléka jako technologický ukazatel

Artificiální redukce (ARPSB) počtu somatických buněk (PSB) syrového mléka může ovlivnit jeho vlastnosti z analytického, ale i technologického pohledu v mlékárenství.

- 1.) ARPSB byla pokusně provedena centrifugací u 66 vzorků (2 l každý) původního normálního (bazénového, PSB ≤ 400 tis./ml) a abnormálního (bazénového, obohaceného PSB > 400 tis./ml) syrového kravského mléka (2021 - 2022). Po ošetření byl obsah tuku do určité míry snížen.
- 2.) Dále stejná ARPSB byla experimentálně provedena centrifugací u 56 vzorků (30 l každý) původního normálního (bazénového, PSB ≤ 400 tis./ml) a abnormálního (bazénového, obohaceného PSB > 400 tis./ml) syrového kravského mléka (2023 - 2024). Zde byl případný pokles obsahu tuku koncentračně prakticky dorovnan na stejnou hodnotu původního mléka.

Výsledky sledování (1.) pro kysací schopnost mléka (KSM; jogurtový test) jsou shrnuty v Tab. 4 a 5. Další sledování KSM (2.), když bylo zpracováno 56 vzorků bazénového mléka a mléka bazénového s přidavkem abnormálního mléka (vyšší PSB = subklinická mastitida s negativním RIL) a 56 jejich ekvivalentů s ARPSB, ukázalo, při nastavení technologie ARPSB cca na 50 % redukce PSB, následující výsledky:

- PSB v původním mléce 2023 - 2024: 574 ± 780 tis./ml (vx 136 %) při geometrickém průměru (xg) 331 tis./ml (n = 56);
- v ČR byly PSB v komerčně dodaném mléce v té době (SLÁDEK, 2024): 240 tis./ml, 2015; 223, 2016; 231, 2017; 226, 2018; 221, 2019; 230, 2020; 227, 2021; 235, 2022; 235 tis./ml, 2023;
- PSB v mléce po ARPSB: 294 ± 458 tis./ml (vx 55,7 %) při xg 153, to je o 280 ± 353 méně, (n = 56);
- změna v PSB -50 % (záměrný, experimentální posun; P < 0,001), u ostatních mléčných ukazatelů, byla změna pouze (relativně, 100 % = původní mléko): aktivní kyselost pH 1,03 %; elektrická konduktivita mléka -0,43 %; bod mrznutí mléka 0,15 %; obsah tuku

0,2 %; obsah hrubých bílkovin 0,09 %; obsah kaseinu -0,28 %; obsah monohydrátu laktózy 0,08 %; obsah sušiny tukuprosté 0,12 %; obsah sušiny celkové 0,09 %; koncentrace močoviny -3,32 %; obsah volných mastných kyselin 0,87 %; koncentrace kyseliny citronové -0,52 %;

- rozdíl u PSB je po ARPSB velmi výrazný, u ostatních mléčných ukazatelů je prakticky zanedbatelný. Sada vzorků původního a falšovaného mléka (ARPSB) se lišila pouze v PSB, z hlediska ostatních mléčných ukazatelů byly sady identické (n = 56);
- oba soubory jsou tak vhodné (srovnání PSB k výsledkům SLÁDEK, 2024) k provedení pokusů pro získání účinné analytické identifikační metody pro ARPSB k podpoře zajištění autenticity syrového mléka k mlékárenskému zpracování;
- průměr KSM původního mléka byl $32,51 \pm 2,6$ °SH, vx 8,0 % (n = 49);
- průměr KSM po ARPSB mléka byl $33,8 \pm 2,88$ °SH, vx 8,5 % (n = 49);
- rozdíl v KSM byl $1,29 \pm 1,0$ °SH, $t = 9,07 = P < 0,001$, vztah KSM před a po ARPSB, n = 49, $r = 0,939$ ($P < 0,001$).

Tab. 4 Výsledky (1.) celkem, stanovení KSM v původním mléce a po ARPSB se zřetelným poklesem tuku.

Soubor	PSB xa	PSB xg	T	B	L	STP	TKM	KSM
n = 66	tis./ml	tis./ml	%	%	%	%	°SH	°SH
I PSB	772 ± 906	405	3,96 ± 0,9	3,59 ± 0,36	4,8 ± 0,31	9,08 ± 0,27	8,1 ± 1,5	28,5 ± 4,7
II ARPSB	376 ± 630	107	2,78 ± 0,85	3,67 ± 0,38	4,85 ± 0,31	9,16 ± 0,28	8,2 ± 1,7	3,67 ± 0,38

PSB = počet somatických buněk (xa = aritmetický průměr, xg = geometrický průměr); T = obsah tuku; B = obsah hrubých bílkovin; L = obsah monohydrátu laktózy; STP = obsah sušiny tukuprosté; TKM = titrační kyselost mléka; KSM = kysací schopnost mléka.

Vzorkování proběhlo během celého kalendářního roku, což představovalo eliminaci případného interferenčního vlivu sezóny na sledovaný efekt. KSM se zlepšila (zvýšila) po ARPSB jak v případě 1., tak v případě 2. To znamená, že případný interferenční vliv sníženého obsahu tuku na výsledek KSM (1.) nebyl zaznamenán. Překvapivým výsledkem pokusu byla lepší (vyšší) KSM pro vyšší PSB v původním mléce (Tab. 5), což v dřívějších našich výsledcích bývalo vždy naopak. Vysvětlení zde může být, že dřívější pokusy zahrnovaly mnohem vyšší počty vzorků mléka s výrazně vyššími PSB.

Tab. 5 Výsledky (1.), podle hladiny PSB, stanovení KSM v původním mléce a po ARPSB se zřetelným poklesem tuku.

Soubor	PSB xa	PSB xg	KSM
	tis./ml	tis./ml	°SH
Ia; n = 34	172 ± 84	151	28,0 ± 4,3
IIa; n = 34	44 ± 39	25	30,8 ± 3,7
Ib; n = 32	1 409 ± 948	1 150	29,1 ± 5,2
IIb; n = 32	729 ± 762	494	31,2 ± 5,5

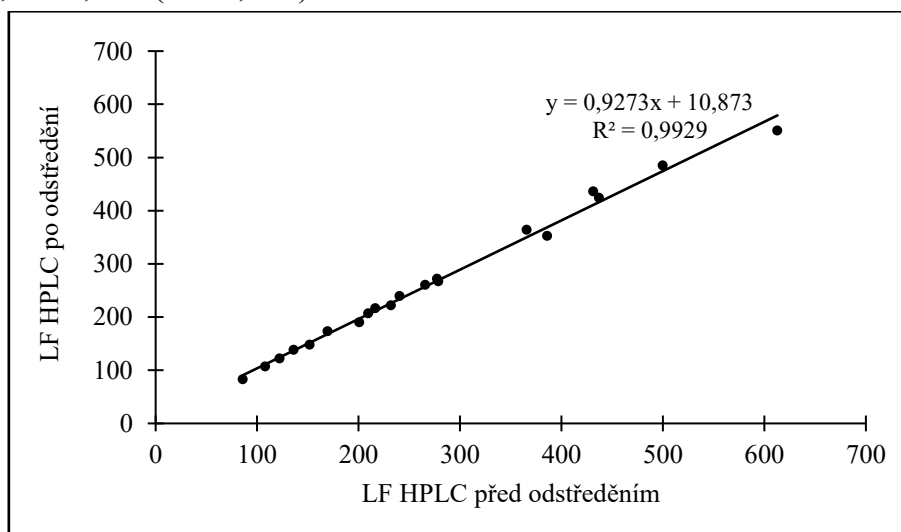
PSB = počet somatických buněk (xa = aritmetický průměr, xg = geometrický průměr); KSM = kysací schopnost mléka; a = do 400 PSB, b = nad 400 tis./ml PSB. Diference Ia – IIa a Ib – IIb pro PSB a KSM = $P < 0,001$.

Hypotetickým vysvětlením pro vzrůst KSM po ARPSB je možnost vyšší inhibice jogurtové kultury imunoglobuliny na leukocytech (PSB) a laktoferinem v neutrofilních leukocytech (na membránách a v endoplazmatickém reticulu). Po ARPSB byly tyto efekty, u laktoferinu jen mírně, sníženy. Ačkoliv je použití ARPSB zcela negativní faktor v potravinovém řetězci z důvodů legislativních, zdravotních a etických, samotné ošetření ARPSB zlepšuje kysací schopnost každého konkrétního mléka.

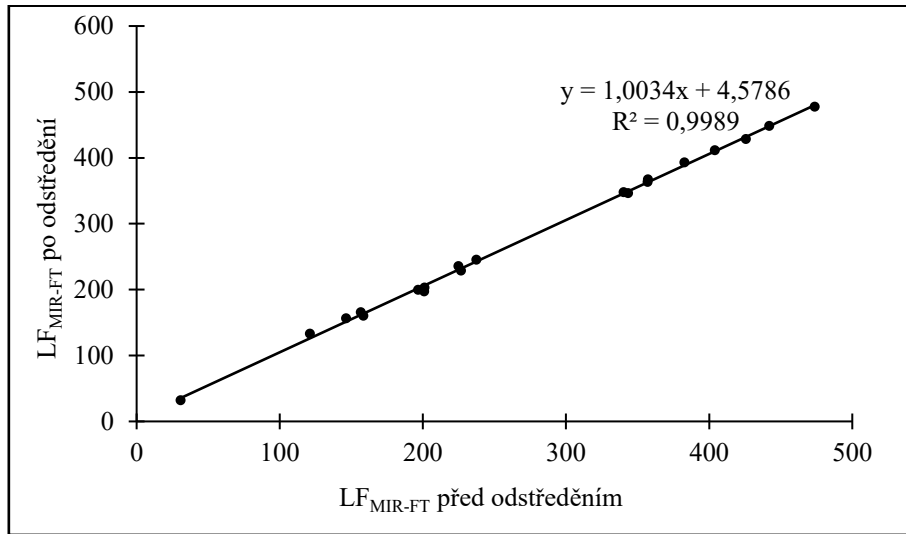
Vliv ARPSB na obsah laktoferinu v mléce

Použití technologie ARPSB na syrové kravské mléko ($n = 20$) za daných podmínek redukovalo PSB o 43,8 %, tzn. o 537 tis./ml ($P < 0,001$; z 1 226 na 689 tis./ml). To souvisí se snížením o 3,3 % LF (o 8,9 mg/l, $P < 0,05$; z 271,5 na 262,6 mg/l) prostřednictvím metody HPLC. Prostřednictvím metody MIR-FT ($n = 20$) to bylo zvýšení LF o 0,67 % (o 1,6 mg/l, $P < 0,001$; z 240,6 na 242,2 mg/l). V dalším pokusu s ARPSB ($n = 68$) bylo zaznamenáno snížení PSB o 48,6 %, tzn. o 287 tis./ml ($P < 0,001$; z 591 na 304 tis./ml). Dále metodou MIR-FT následovalo zvýšení LF o 0,61 % (o 1,39 mg/l, $P < 0,001$; z 228,38 na 229,77 mg/l). Vztahy mezi těmito výsledky LF před a po ARPSB mléka oběma metodami jsou zobrazeny na Obr. 4, 5 a 6. Jsou zde patrné vysoce těsné pozitivní korelace 0,996, 0,999 a 0,999 (všechny $P < 0,001$). Lze konstatovat, že ačkoliv jsou rozdíly v LF statisticky vysoce významné, pro jejich stabilitu, jedná se o klasický případ, kdy je lze označit za prakticky zanedbatelné, neboť se pohybují na hodnotě opakovatelnosti měření referenční metody. Je tedy možné konstatovat, že ARPSB hladinu LF v mléce prakticky téměř vůbec neovlivní, tato i po procesu zůstává zachována. Právě modelová situace zachování případně vysoké hladiny LF po ARPSB při výrazně sníženém PSB, což neodpovídá přirozené situaci, je základem identifikačního potenciálu tohoto postupu pro ARPSB.

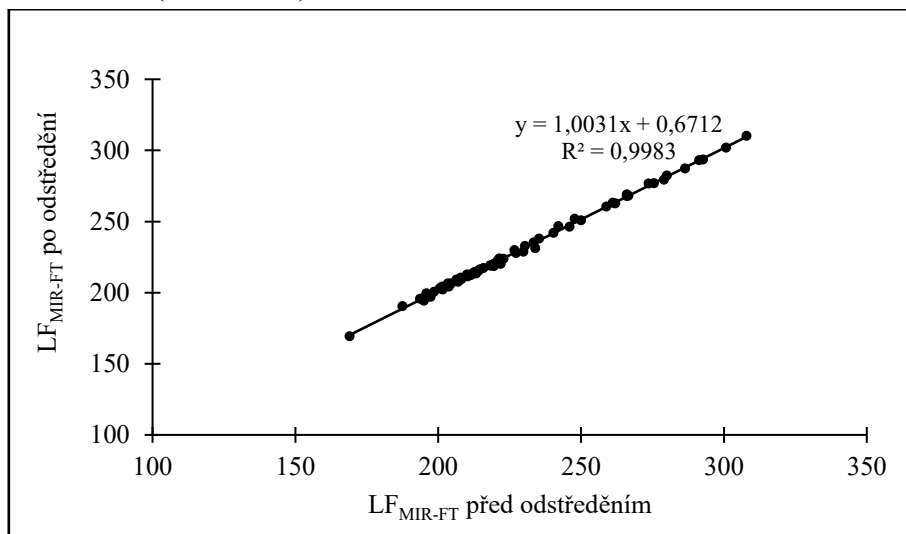
Obr. 4 Lineární regrese mezi obsahem laktoferinu stanoveného metodou HPLC před odstředěním (LF HPLC, původní mléko) a po odstředění (LF HPLC, po ARPSB), $n = 20$; $r = 0,996$ ($P < 0,001$).



Obr. 5 Lineární regrese mezi obsahem laktoferinu stanoveného metodou MIR-FT před odstředěním (LF_{MIR-FT} , původní mléko) a po odstředění (LF_{MIR-FT} , po ARPSB), $n = 20$; $r = 0,999$ ($P < 0,001$).



Obr. 6 Lineární regrese mezi obsahem laktoferinu stanoveného metodou MIR-FT před odstředěním (LF_{MIR-FT} , původní mléko) a po odstředění (LF_{MIR-FT} , po ARPSB), $n = 68$; $r = 0,999$ ($P < 0,001$).



Odhad thresholdu LF pro subklinickou mastitidu, individuální mléko

Na reálných individuálních vzorcích mléka krav z KU byl grafickou metodou konstrukce frekvenční distribuce dat (Obr. 6) LF normálního (N) a abnormálního (A) mléka (podle SCS, Tab. 6) odvozen threshold LF pro subklinickou mastitidu. Ten byl reálně pro soubor 211 vzorků 123,7 a pro soubor 231 (211 zahrnuto) vzorků 128,3 mg/l. Je patrné, že tento odhad se blížil dalším odhadům provedeným na literárních datech s vhodnou databází (184,9, 110,2, 113,9 a 131,8) Tab. 7 a 8.

Tab. 6 Ztráty dojivosti (%; 1. laktace a ostatní laktace) s PSB (SCC, počet somatických buněk) podle lineárního SCS (LS PSB, skóre somatických buněk, 0 - 9), individuální mléko z KU (RENEAU et al., 1983 a 1988; * hranice používaná k rozlišení pravděpodobně infikovaných od pravděpodobně zdravých dojnic).

Lineární bodové hodnocení PSB (SCS)	PSB 10 ³ ×ml ⁻¹		Relativní ztráta dojivosti %	
	Střed	Rozsah	I. laktace	II. a další laktace
0	12,5	0 – 17	0	0
1	25	18 – 34	0	0
2	50	35 – 70	0	1
3	100	71 – 140	1,5	2,5
4	200	141 – 282	3,3	5,0
5	400	283 – 565 *	5,1	7,4
6	800	566 – 1130	6,6	9,9
7	1600	1131 – 2262	8,4	12,6
8	3200	2263 – 4525	9,9	15,0
9	6400	4526 –	11,7	17,5

Lineární skóre PSB (SCS) a LF v mléce

Transformace dat mléčných ukazatelů jsou někdy nezbytné (zde PSB a LF), logaritmické, ale i jiné, vrcholem je pak Box-Coxova transformace, kterou lze tak „ohýbat“ vhodnou modifikací řídicího členu, že téměř vždy dosáhne normality transformovaných dat. U mléka jsou transformace dat třeba zejména pro celkový počet mikroorganismů (a ostatní mikrobiologické ukazatele jako termorezistentní a psychrotrofní bakterie atd. – v bazénovém mléce), PSB, VMK, ketony (aceton) a třeba laktoferin (v individuálních vzorcích mléka v KU), z důvodu dosažení normality a regulérnosti dalšího statistického testování (HANUŠ et al., 2001, 2007, 2009, 2011; JANŮ et al., 2007). Zde také jsou lepšími středními ukazateli souborů, při jejich původní nenormalitě, geometrické průměry (resp. průměry logaritmovaných hodnot) nebo mediány, pro jejich reprezentaci. Tedy s ohledem na základ, nejčastěji se používají přirozené Napierovy logaritmy (základ 2,718, Eulerovo číslo), nebo dekadické. V podstatě záleží na souboru dat, jeho charakteristikách (jaká je tam původní variabilita, zda 10, 30, 100 nebo 300 % ve variačním koeficientu, jaké jsou tam extrémy atd.), a lze měnit základ k dosažení lepší normality. Proto byla rozpracována problematika SCS (skóre PSB) pro PSB. Tato Ali-Shook-Reneau-Raubertas-Wiggansova transformační rovnice (LS PSB (SCS) = log₂ (PSB/100) + 3, kde PSB = v tis./ml) je skutečně úspěšné vědecké dílo. Pro účely transformace dat PSB je velmi vhodná, často se používá ve vědeckých časopisech, ale je i praktickým základem kontroly mastitid a ztrát mléka přes analýzy KU (ALI a SHOOK, 1980; SHOOK, 1982; RAUBERTAS a SHOOK, 1982; RENEAU et al., 1983 a 1988; RENEAU, 1986; WIGGANS a SHOOK, 1987). V USA (Minnesota) v KU pracuje tento systém úspěšně asi od roku 1983, jinde podle států s postupnými modifikacemi, jako měsíční protokol pro farmáře ohledně rizika a odhadu ztrát mléka z výskytu subklinických mastitid, cca již 40 roků. Ve světě byly hodnoty SCS za laktaci u prvotetek použity i jako vstupní hodnoty pro odhady plemenných hodnot býků (otců) pro zdraví mléčné žlázy u jejich dcer (jejich odolnost vůči mastitidě). Za mastitidně podezřelou krávu se považuje (Tab. 6), bez nároku na jistotu (pravděpodobně, systém nezohledňuje výsledek bakteriologického vyšetření, který není rutinně dostupný), hodnota 283 tis./ml, tedy od 5. třídy SCS. Dojnice jsou značeny v aktuálních sestavách jako mastitidně podezřelé. Toto SCS od 0 do 9, což je výstupem dané transformační rovnice, je používáno třeba i pro odhad plemenných hodnot otců pro PSB a jeho redukci šlechtěním, tedy posílení mastitidní rezistence dcer. Prakticky je ale používáno

především k teoretickému odhadu pravděpodobných ztrát mléka na krávu podle PSB a laktace a odhadu finanční ztráty a tato informace je poskytnuta chovatelům. Rovnice má log základ 2 a je obecně platná i po letech, i když byla odvozena od plemene Holštýn, k linearizaci vztahu PSB a ztrát mléka v % produkce (Tab. 6) z původně nelineární závislosti dojivosti na zdravotním stavu vemene. Ztráta je podle krav vypočtena farmáři za stádo a určí, kolik finančně ztrácí při daném stavu, a že by měl tedy investovat do prevence. Každý měsíc je vytvořena zpráva za stádo. Proto se s SCS (0 – 9, 10 tříd) dobře pracuje, když rovněž redukuje počet číslic v pravidelných počítačových sestavách, zprávách, a na pohled i fakticky je jednoduché pro chovatele.

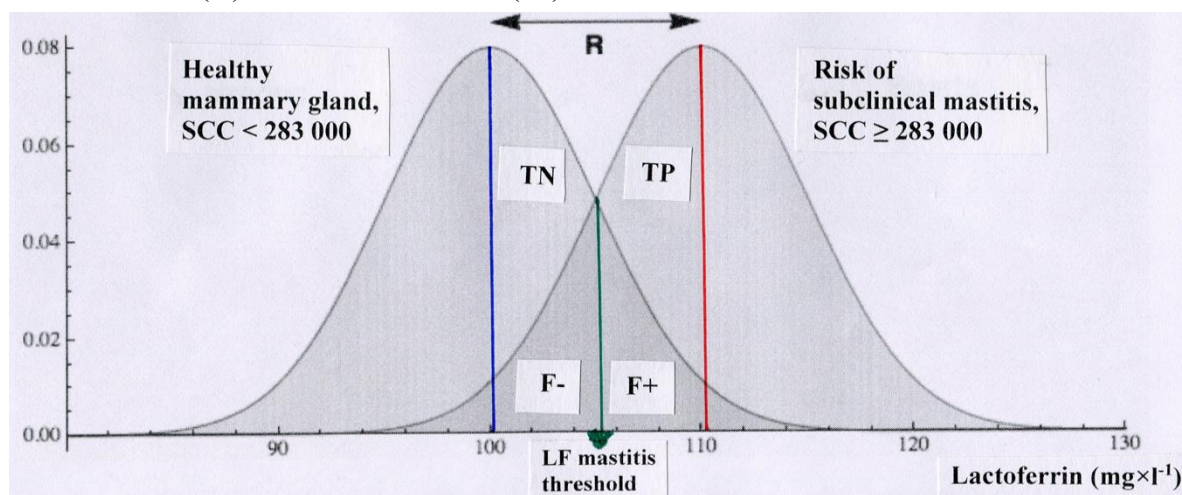
Odhad thresholdu LF a PSB pro indikaci ARPSB, bazénové mléko

Postupy odvození limitu LF v mléce (individuální vzorky) pro subklinickou mastitidu (Obr. 7; Tab. 7 a 8) a konfrontace s hodnotami LF (HPLC) ve třídách SCS (Tab. 6 a 9), úvahou, umožňují v metodice navrhnout limit (jako průměr vlastních a literárních hodnot) pro tzv. „vysoký LF“ (indikační limit), zakládající v bazénovém mléce (vzorku) oprávněně podezření z přítomnosti neoprávněného (podezřelého) zastoupení mastitidního mléka v dodávce ke zpracování do mlékárny (tzn. z důvodu pro aplikaci ARPSB v praxi) pokud PSB (indikační limit) bude souběžně „nízký“.

Obr. 7 Schéma odvození thresholdu LF pro subklinickou mastitidu podle hodnoty PSB, resp. SCS.

Hypotetické znázornění:

- Vlastní data, soubory A (n = 120), B (n = 91) a C (n = 20), celkem 211 (231) vzorků.
- Rozdělení dat na základě obecně uznávaného thresholdu pro PSB < 5 (PSB < 283 tis./ml) v systému kontroly užitkovosti:
 - PSB skóre (SCS) < 5, tj. PSB (SCC) < 283 tis./ml = normální (N) mléko – získáno 151 (159) vzorků;
 - PSB skóre (SCS) ≥ 5, tj. PSB (SCC) ≥ 283 tis./ml = podezření na abnormální (A) mléko – získáno 60 (72) vzorků.



SCC (PSB) = počet somatických buněk; LF mastitis threshold = prahová hodnota laktoferinu pro subklinickou mastitidu (v realitě = 123,7 mg/l pro 211 a 128,32 mg/l pro 231 vzorků mléka); Healthy mammary gland (zdravá mléčná žláza); Risk of subclinical mastitis (riziko subklinické mastitidy); TN = true negative, pravdivě negativní; TP = true positive, pravdivě pozitivní; F- = false negative, falešně negativní; F+ = false positive, falešně pozitivní.

Tab. 7 Vybrané literární vědecké zdroje informací ke vztahu LF v mléce k mastitidě.

- Existence rychlé metody stanovení LF + vztah LF ke zdraví mléčné žlázy

=> možnost využití informace o obsahu LF ke kontrole zdraví mléčné žlázy => potřeba ustanovit diskriminační limit LF pro zdravou mléčnou žlázu:

Publikace	Země	Plemeno	Počet	LF (mg/l)	Metoda stanovení LF	Diagnostika mastitidy
HAGIWARA et al., 2003	Japonsko	Holštýn	111	169,8	radiální imunodifúze	mikrobiologické vyšetření
CHENG et al., 2008	Čína	Holštýn	122	115,4	sendvičová ELISA	PSB, limit 141 tis./ml
CHANETON et al., 2008	Argentina	-	139	121	kompetitivní ELISA	mikrobiologické vyšetření
NIERO et al., 2023	Itálie	Holštýn Simentál	1 746	129,5	radiální imunodifúze	PSB, limit 200 tis./ml

Tab. 8 Odhad metaanalytického charakteru pro threshold LF v mléce pro subklinickou mastitidu z vhodných vědeckých prací.

LF práh (subklinická mastitida) v mléce: postup metaanalýzy z literárních zdrojů (4) rekonstrukcí distribuce frekvence hodnot LF podle normálního výskytu mléka versus patogeny nebo SCS (SCC) rozdělení vzorků do specifických skupin:

- pro HAGIWARA et al., 2003, Japonsko, patogeny a SCS, n = 111 normální a 270 abnormální (patogeny), 184,9 mg/l, vzorky čtvrťové, radiální imunodifúze (RID);
- pro CHENG et al., 2008, Čína, SCS, n = 122 normální a 76 abnormální, 110,2 mg/l, vzorky individuální, ELISA;
- pro CHANETON et al., 2008, Argentina, patogeny, n = 139 normální a 122 abnormální (patogeny), 113,9 mg/l, vzorky individuální, ELISA;
- pro NIERO et al., 2023, Itálie, SCC, n = 1 746 normální a abnormální, 131,8 mg/l, vzorky individuální, radiální imunodifúze (RID).

Další podpůrný příspěvek k odhadu limitu LF pro ARPSB poskytuje soubor n = 20 analyzovaný HPLC podél ARPSB. Zde, u vzorků (n = 11; bazénové mléko) s PSB \leq 400 tis./ml (oficiální limit kvality mléka evropské legislativy = standardní mléko), byl průměr PSB 279 ± 135 tis./ml ($v_x = 48,4\%$) a LF referenční metodou HPLC $212,1 \pm 145,6$ mg/l ($v_x = 68,6\%$). $212,1$ mg/l + $1,65 \times$ sigma ($145,6$ mg/l) pro pokrytí celé frekvenční distribuce dat LF normálního, standardního mléka (90 %; konvenčních 5 % mimo interval spolehlivosti pro jednostranné omezení) je 452,3 mg/l.

Jiný podpůrný příspěvek k odhadu limitu LF pro ARPSB poskytuje soubor n = 71 analyzovaný MIR-FT po rekalkulaci na HPLC (adjustace dat relevantní rovnicí: y (LF HPLC) = $1,3093x$ (LF MIR-FT) - $131,33$ (n = 120), NEJESCHLEBOVÁ et al., 2023, 2024) podél ARPSB. Zde, u vzorků (n = 52; bazénové mléko) s PSB \leq 400 tis./ml (oficiální limit kvality mléka evropské legislativy = standardní mléko), byl průměr PSB 226 ± 123 tis./ml ($v_x = 54,4\%$) a LF činil metodou MIR-FT (HPLC adjustace) $151,8 \pm 32,8$ mg/l ($v_x = 21,6\%$). $151,8$ mg/l + $1,65 \times$ sigma ($32,8$ mg/l) pro pokrytí celé frekvenční distribuce dat LF normálního, standardního mléka (90 %; konvenčních 5 % mimo interval spolehlivosti pro jednostranné omezení) je 205,9 mg/l.

Tab. 10 Technologický popis rámcových podmínek a faktorů vybraných, pravděpodobných variant použití ARPSB v praxi prvovýroby mléka.

Velikost a zdravotní stav stáda dojnic.	Výkon zařízení ARPSB.	Faktorové nastavení postupu.	Technologická poznámka.
Velké stádo, více než 300 dojnic, s vyšším promořením SM (nad 30 %), např. PSB bez selekce mléka cca 500 103×ml-1.	Vysoký, v tisících l za hodinu.	Průtočné ošetření veškerého mléka s nastavením ARPSB 30 až 50 %.	Principem vždy, je nesnížit PSB až na podezřele nízkou úroveň pro bazénové mléko, např. méně než 100 103×ml-1. PP, KO = 7.
Velké stádo, více než 300 dojnic, s vyšším promořením SM (nad 30 %) např. PSB bez selekce mléka cca 500 103×ml-1.	dtto	Ošetření větší části selektovaného mléka (cca 50 %) se SM, nastavením ARPSB cca až o 65 % a přilítí tohoto podílu do neošetřeného bazénového mléka.	Principem vždy, je nesnížit PSB až na podezřele nízkou úroveň pro bazénové mléko, např. méně než 100 103×ml-1. PP, KO = 4.
Dtto	Střední, ve stovkách l za hodinu.	Ošetření větší části selektovaného mléka (cca 25 %) se SM, nastavením ARPSB cca až o 80 % a přilítí tohoto podílu do neošetřeného bazénového mléka.	PP, KO = 1.
Velké stádo, více než 300 dojnic, s běžným promořením SM (do 30 %), např. PSB bez selekce mléka cca 300 103×ml-1.	Střední, ve stovkách l za hodinu.	Ošetření části selektovaného mléka (cca 12 %) se SM, nastavením ARPSB cca 60 % a přilítí tohoto podílu do neošetřeného bazénového mléka.	Zařízení ARPSB s malým výkonem zde nedává smysl. PP, KO = 2.
Střední stádo, 100 až 300 dojnic, s vyšším promořením SM (nad 30 %), např. PSB bez selekce mléka cca 500 103×ml-1.	dtto	Ošetření větší části selektovaného mléka (cca 30 %) se SM, nastavením ARPSB cca 70 % a přilítí tohoto podílu do neošetřeného bazénového mléka.	PP, KO = 3.
Střední stádo, 100 až 300 dojnic, s běžným promořením SM (do 30 %), např. PSB bez selekce mléka cca 300 103×ml-1.	Malý, v desítkách l za hodinu.	Ošetření části selektovaného mléka (cca 15 %) se SM, nastavením ARPSB cca 70 % a přilítí tohoto podílu do neošetřeného bazénového mléka.	PP, KO = 5.
Malé stádo, do 100 dojnic, s vyšším promořením SM (nad 30 %), např. PSB bez selekce mléka cca 500 103×ml-1.	Malý, v desítkách l za hodinu.	Ošetření části selektovaného mléka (cca 40 %) se SM, nastavením ARPSB cca 70 % a přilítí tohoto podílu do neošetřeného bazénového mléka.	Středně výkonné zařízení pro ARPSB může být cenově náročné. PP, KO = 6.
Malé stádo, do 100 dojnic, s běžným promořením SM (do 30 %), např. PSB bez selekce mléka cca 300 103×ml-1.	Malý, v desítkách l za hodinu.	Ošetření části selektovaného mléka (cca 15 %) se SM, nastavením ARPSB cca 60 % a přilítí tohoto podílu do neošetřeného bazénového mléka.	PP, KO = 8.

ARPSB = artificiální redukce počtu somatických buněk; KO = kvalifikovaný odhad; PP = pořadí pravděpodobnosti; PSB = počet somatických buněk; SM = subklinická mastitida.

Z uvedeného vyplývají pro kombinovaný, kvalifikovaný odhad thresholdu LF bazénového mléka pro indikaci ARPSB váhy 11 a 52 pro $n = 63$. LF $162,3 \pm 52,5$ mg/l ($v_x = 32,3$ %). $162,3$ mg/l + $1,65 \times$ sigma ($52,5$ mg/l) k pokrytí celé frekvenční distribuce dat LF normálního, standardního mléka (90 %; konvenčních 5 % mimo interval spolehlivosti pro jednostranné omezení) je $248,9$ mg/l (cca 250 mg/l).

Limit nízkého PSB lze prostou úvahou odvozovat od standardního limitu EU ≤ 400 tis./ml, kdy každý případný operátor nelegální ARPSB bude vyvíjet snahu získat jistotu tlakem na dosažení zřetelné rezervy vůči limitu standardnímu, kdy tento ukazatel podléhá pravidelné kontrole při komerčních dodávkách syrového mléka (KKM). Proto rozumnou hodnotou pro PSB může být ≤ 350 tis./ml. Tento limit PSB je níže oficiálního (400 tis./ml) z důvodu předpokladu záměrného zisku komerční rezervy případnými provozovateli technologie ARPSB, nicméně, stále je spojen s možností výskytu subklinických mastitid ve stádě cca 15 až 20 % a ztrátou produkce mléka stáda dojníc o 3 – 4 % (WENDT et al., 1994). Respektované limity pro subklinickou mastitidu a kvalitu kravského mléka u PSB pak jsou: > 100 tis./ml pro čtvrtové mléko; > 150 tis./ml pro individuální mléko; ≤ 400 tis./ml pro bazénové mléko. Z velmi podobné logiky věci, a prokázané existence negativní korelace mezi PSB a LF, by i opačný limit LF měl být výše, než leží odhadnutý threshold LF pro subklinickou mastitidu u dojníc v KU (individuálních vzorků mléka), který může kolísat (Tab. 8) mezi 110 až 132 (CHENG et al., 2008; CHANETON et al., 2008; NIERO et al., 2023; vlastní výsledky 128) mg/l, nebo pro čtvrtové vzorky mléka 185 mg/l (HAGIWARA et al., 2003).

Po zohlednění všech zmíněných faktorů kvalifikovaným odhadem pro daný účel:

- „vysoký LF“ (indikační limit) může být > 250 mg/l;
- „nízký PSB“ (indikační limit) může být ≤ 350 tis./ml.

Diskuse vybraných aspektů odhadu ARPSB

Při rozdělení hodnot LF HPLC ($n = 231$, individuální mléko v KU) podle tříd SCS (0 – 9; Tab. 6 a 9) je zřejmé, že praktická konstelace pro případné ošetření mléka ARPSB nastává u tříd SCS 5 až 7. Je pravděpodobné, ale ne jisté, že mléko z tříd 8 až 9 již takto ošetřeno nebude, neboť už může mít i změněný vzhled (vločky v mléce) atp., v důsledku mastitidy. Tyto zájmové třídy (5 až 7) zahrnují mléko, které (Tab. 9) vykazuje průměrné hodnoty LF 182,1 až 288,4 mg/l, tedy někde zde by mohl ležet, pro konfrontaci, indikační limit LF pro ARPSB.

Je známo, že při PSB 400 tis./ml (limit EU pro standardní mléko) v bazénovém mléce je předpokládána redukce doживosti stáda krav až o 4 % (WENDT et al., 1994) a v podstatě to znamená, že ve stádě může být přítomno stále 20 až 30 % zvířat se subklinickou mastitidou při incidenci klinických mastitid kolem cca 1 % (pravděpodobně do 2 %). U mléka individuálního v KU je už za mastitidně podezřelý stav považována hodnota PSB nad 150 až 175 tis./ml a u čtvrtového i nad 100 až 125 tis./ml. Za přísnějšího limitu v EU je pak trend k aplikaci ARPSB v praxi silnější. Některé státy USA operovaly s výrazně benevolentnějším limitem PSB 600 až 750 tis./ml u komerčního, syrového, farmářského kravského mléka. Pak předpoklad ztráty doживosti je až 9 % a incidenci subklinických mastitid lze odhadovat na 35 až 45 % a klinických pak na 3 % i více (kvalifikovaný odhad ze zkušenosti).

Tab. 9 Průměrné hodnoty laktoferinu (LF) v mléce různými metodami podle distribuce počtu somatických buněk (PSB) v třídách SCS (skóre PSB).

	n = 231	PSB	LF HPLC	LF MIR-FT, původní kalibrace (ELISA)	LF MIR-FT, aktuální kalibrace (HPLC)
SCS	n	tis./ml	mg/l	mg/l	mg/l
0	24	8	71,3	201,1	92,6
1	27	26	99,9	215,1	110,1
2	42	54	75,3	216,0	95,1
3	28	103	108,2	218,4	115,2
4	36	208	138,1	221,6	133,5
5	25	406	204,0	228,7	173,8
6	23	819	288,4	246,3	225,4
7	7	1 380	182,1	241,1	160,4
8	14	3 424	235,5	248,7	193,1
9	5	7 743	478,1	301,4	341,4

Zatímco neobvyklá situace záchytu „vysokého LF“ a „nízkého PSB“ v individuálním mléce (KU) může znamenat potenciálně predikční hodnotu (způsobnost) LF pro budoucí mastitidu (hypotéza odvozena z výsledků práce CARLSSON et al., 1989), podobný nálezný v mléce bazénovém (KKM) s vysokou pravděpodobností značí podezření na použití technologie ARPSB.

Příklady úvahy u vybraných variant možností praktické aplikace ARPSB

Autenticita potravinových surovin a potravin je společensky, zdravotně i komerčně významný faktor a důležité téma, kdy tato má být dle platné potravinové legislativy vždy plně zajištěna kontrolou příslušných kvalitativních ukazatelů. Případná praktická aplikace ARPSB, jako nekalé komerční praktiky, předpokládá kombinaci řady obchodních, sociálních, zdravotních, chovatelsko-technologických a technických faktorů. Pokud jde o konkretizaci těchto faktorů, lze ve výčtu uvést ty základní následovně: velikost stáda dojnic, aktuální zdravotní stav stáda (objem vyřazovaného mléka z důvodů poruch sekrece), mléčná užitkovost, typ dojení krav, počet a objem úložných tanků pro mléko, farmářská cena mléka, pořizovací cena zařízení pro ARPSB, výkon zařízení ARPSB, kvalifikace a spolehlivost dojícího personálu. Konkrétně použitý postup ARPSB je pak výslednicí kombinace jmenovaných lokálních faktorů. Jednotný model použití proto nemůže existovat, spíše velká řada jeho modifikací a variant. Právě pro tuto mnohotvárnost je proto poměrně komplikované navrhnout obecný, studijní, experimentální design pro získání relevantních informací, jak tento jev případně identifikovat. V Tab. 10 jsou uvedeny jen vybrané, pravděpodobné varianty použití centrifugačního ošetření, resp. postupu ARPSB v praxi.

Model pro studium potenciálních analytických metod pro identifikaci ARPSB byl proto nastaven tak, aby pokrýval běžné rozpětí hodnot PSB v bazénovém syrovém kravském mléce, ale také ve výraznějším zastoupení zvýšené PSB, tzn. na mléce původním bazénovém a mléce s přísádkou abnormálního mléka subklinických mastitid v poměru cca 50 / 50 %.

Navržené strukturované pohledy (varianty) možného využití ARPSB v praxi (Tab. 10), jsou modelové a nemohou postihnout v celé šíři veškeré skutečně nastalé praktické

mezivarianty. Jako komplikace se také ukazuje, že potenciální identifikační analytické metodické postupy, kterých je podle okruhů 5 (až 6 včetně zohlednění LF), se pohybují na hraně faktu, že případná schopnost identifikace ARPSB by platila především pro průchod celého uvažovaného objemu mléka ošetřením ARPSB, což v praxi nastat sice může, ale spíše zřídka ze skutečných případů. Většinou půjde o zmíněné mezivarianty přilítí (Tab. 10).

Lze uvést kvalifikovaný odhad, že metoda přilítí ARPSB v produkci suroviny v praxi může být hlavním omezujícím faktorem případné identifikační způsobilosti metody průtočné cytometrie mléka při stanovení PSB s ohledem na formulaci pokusné hypotézy. Právě tato skutečnost, že obvykle se může jednat o kombinaci přilítí menšího objemu mléka ošetřeného ARPSB do většího objemu původního bazénového mléka (bez příspěvku zátěže ARPSB), je důvodem pro potřebu kombinace výsledků všech prokázaných, identifikačně způsobilých metod, při pokusu o reálnou, vysoce pravděpodobnou detekci rizika použití ARPSB v praxi.

Je tedy logicky přirozené, že detekční potenciál všech ověřených metod pro průkaz ARPSB bude klesat přímo úměrně s menším se podílem mléka ošetřeného ARPSB a přidávaného do mléka původního v dodávce do mlékárny. Na druhé straně, stejně úměrně bude klesat i riziko tohoto vlivu na případné ohrožení bezpečnosti mléčného potravinového řetězce. Závažnější a závažné případy vyššího podílu tohoto objemu mléka s ARPSB by však měly být prokazatelné.

4) Závěr metodiky pro odhad rizika ARPSB

Použití analytického postupu pro aproximační odhad rizika artificiální redukce počtu somatických buněk (ARPSB) v mléce je vyhrazeno pro bazénové mléko stáda dojníc (BVM) o alespoň 8 kravách (tedy s omezením vlivu časné laktace, ale zejména prodloužené).

Aplikací uvedených typů analýz (počtu somatických buněk (PSB) průtočnou cytometrií (FC) a laktoferinu (LF) v bazénovém mléce metodou HPLC nebo MIR-FT) a vhodnou kombinací výsledků lze odhadnout podezření na praktickou aplikaci ARPSB jako nelegální praxe. Tato situace nastává u BVM: - při záhytu koncentrace LF v syrovém kravském mléce $> 250 \text{ mg/l}$; - při souběžném záhytu PSB $\leq 350 \text{ tis./ml}$.

Postup metodiky nestačí sám o sobě zcela pro pevný závěr k identifikaci ARPSB, a bude muset být metodicky podepřen (doplněn dalším pravděpodobnostním postupem) podle dalších metodicko-analytických nálezů řešeného projektu MZe NAZV ZEMĚ QK 21010212. To znamená, že bude muset být v kombinaci použito více postupů pro zvýšení pravděpodobnosti detekce případné ARPSB s tím, že i tak budou metody schopny, kvůli prokázané komplikovanosti problému, prokazovat jen případy ARPSB hrubšího charakteru. Přesto výsledky nabízí dílčí řešení doposud neřešeného a i téměř neřešitelného problému.

Metodika je inovativním rozšířením portfolia nabízených analytických, rutinních, laboratorních služeb v oboru infračervené spektroskopie mléka, jeho průtočné cytometrie a identifikačních možností technologických nedostatků v mlékařství.

Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice

vyvinutá metodika byla předána pro užívání v systému kontroly kvality mléka a laboratorní práce (Svaz výrobců mléka a. s. Šumperk) v elektronické podobě

- jedná se o nový validovaný postup monitorovací, příležitostně vyžádané kontroly autenticity syrového kravského mléka za použití moderních analytických metod pro podporu bezpečnosti mléčného potravinového řetězce. Metodika je inovativním rozšířením portfolia nabízených analytických, rutinních, laboratorních služeb v oboru infračervené spektroskopie mléka a průtočné cytometrie pro podporu veřejného zájmu ze strany oficiálních autorit. Výsledky jsou jednak uvedením nových poznatků a také rozšířením dosavadních poznatků i dále uvedením známých poznatků v nových souvislostech;
- vývoj postupu a metody specificky indikované kontroly autenticity (případného falšování) syrového kravského mléka podle kombinace výsledků mléčných ukazatelů počtu somatických buněk a koncentrace laktoferinu je zajištěn vlastními konkrétními výsledky získanými při řešení projektu a retrospektivní komparací a analýzou vlastních předchozích výsledků pracoviště stejně jako vědeckých literárních podkladů. Vyhodnocením těchto výsledků a sestavením návrhů vznikl postup, který je metodickým podkladem pro laboratoře kontroly kvality mléka pro zajištění autenticity mléčné suroviny a podporu bezpečnosti mléčného potravinového řetězce;
- uvedené postupy rychlých analýz pro podporu kontroly autenticity mléka a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce v indikovaných případech zatím nebyly v ČR ani jinde ve světě v kontrole kvality mléka používány. Jde o návrh nového postupu v oblasti kontroly doposud analyticky neobsazené.

Popis uplatnění metodiky.

- kontrola fyzické existence metodiky jako pracovního postupu pro možnou podporu kontroly autenticity syrového mléka (u VÚM);
- kontrola implementace a možné praktické aplikace metodiky je proveditelná prostřednictvím revize dokladů workshopů ke zlepšování kvalifikace odborného laboratorního personálu (programy, PP-prezentace a jejich písemné poznámkové verze, prezenční listiny, personální certifikáty o absolvování) v relevantních laboratořích kontroly kvality mléka (např. Laboratoř rozborů mléka Brno, Českomoravská společnost chovatelů a. s. (ČMSCH a.s.), nebo pracovníci příjmových laboratoří mlékáren);
- metodika postupu specifického stanovení podezření na porušení autenticity syrového kravského mléka pro podporu kvality a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce byla vydána elektronicky a předána na pracoviště Bentley Czech s.r.o. Prostějov a Moravia Lacto, a.s. Jihlava. Informace o metodice bude součástí zprávy za příslušný výzkumný projekt podána na MZe a také bude vložena do databáze RIV.

Ekonomické aspekty.

Ekonomický dopad je součástí kontroly kvality mléka (KKM) a využití výsledků je v prevenci hygienicko-technologických problémů mléčných potravin a tedy podpoře bezpečnosti mléčného potravinového řetězce. Výsledky postupu jsou ve veřejném zájmu a ekonomický přínos je v podstatě nemožné odhadnout, neboť není známo v jaké míře je nelegální ARPSB prakticky realizována. Vyvinutý postup nabízí analytickou možnost postihnout dosud velmi obtížně postižitelnou nelegální praktiku ARPSB. Na bázi preventivní podpory kvality a hygieny mléčných potravin může velmi přibližným kvalifikovaným odhadem tvořit podíl do 1 % přínosu z nárůstu kvality a bezpečnosti v celém segmentu. Objem případných ztrát z ARPSB je ovšem obtížné vyčíslit konkrétněji. Na úrovni státu může ročně přínos z aplikace kontroly činit částky v řádu statisíců.

Náklady na konkrétní zavedení a využití postupu uvedeného v metodice mohou pro uživatelské laboratoře kontroly kvality mléka (KKM) činit, v závislosti na technickém vybavení, podle kvalifikovaného odhadu celkem nižší desetitisíce Kč jednorázově (náklady na implementaci predikčních modelů metody LF MIR-FT, kdy PSB je běžně dostupný). Přínos pro uživatele postupu je tedy obtížné vyčíslitelný, spočívající v možnosti kontroly porušování autenticity suroviny a podpoře bezpečnosti potravin ve veřejném zájmu.

Metodika se uživatelským firmám poskytuje pro technologické ověření.

Seznam použité související literatury.

Použité jiné literární prameny při tvorbě metodiky

- ALI A. K. A., SHOOK, G. E.: An optimum transformation for somatic cells concentration in milk. *Journal of Dairy Science*, 63, 1980, 487–490.
- BAUMGARTNER CH., und Expertengruppe für Qualitätssicherung und Qualitätsmanagement (2000): Qualitäts 2000. Leitfaden für den Betrieb von Routine – Untersuchungsgeräten in Rohmilch – Prüfungslaboratorien, 1. Ausgabe, Oktober, 32.
- BUCEK P., KUČERA J., CHMELÁŘ M., KRUPA E., VOBECKÁ J., LIPOVSKÝ D.: *Studie Q CZ 2020*. ČMSCH, 2021.
- CARLSSON A., BJORCK L., PERSSON K.: Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest P. *Journal of Dairy Science*, 72, 1989, 3166–3175.
- CECHOVNÍ NORMA, Syrové kravské mléko, 2016-03-18-0127, dobrovolný akreditační systém Potravinářské komory České republiky (PKČR), 2016.
- CSN EN ISO/IEC 17025. 2005. Conformity assessment - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. *Czech Normalization Institute (In Czech)*, Prague.
- CSN EN ISO 13366–1 (57 0531). 1998. Milk – Somatic cell count determination – Part 1: Microscopy method. *Czech Normalization Institute*, Prague.
- CSN EN ISO 13366–2 (57 0531). 2007. Milk – Somatic cell count determination – Part 2: Manual for fluoro–opto–electronic instrument operation. *Czech Normalization Institute*, Prague.
- ČSN 57 0529: Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování. Raw cow's milk for dairy treatment and processing. (In Czech) *Czech Normalization Institute*, Prague, 1993.
- ČSN 57 0530: Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. Methods for testing of milk and milk products. (In Czech) *Czech Normalization Institute*, Prague, 1973.
- ČSN 57 0536: Determination of milk composition by mid-infrared analyzer. (In Czech) 1999: ČNI Praha.
- ČSN ISO 8196-1 (570536). 2016. Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 1: Analytické atributy alternativních metod.
- ČSN ISO 8196-2 (570536). 2016. Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 2: Kalibrace a řízení kvality v laboratoři při analýzách mléka alternativními metodami.
- ČSN ISO 8196-3 (570536). 2016. Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 3: Protokol pro hodnocení a validaci alternativních metod pro analýzu mléka.
- GALFI A. L., RADINOVIČ M. Ž., BOBOŠ S. F., PAJIČ M. J., SAVIČ S. S., MILANOV D. S.: Lactoferrin concentrations in bovine milk during involution of the mammary glands with different bacteriological findings. *Veterinarski Arhiv*, 86, 4, 2016, 487–497.
- GIANSANTI F., PANELLA G., LEOFFE L., ANTONINI G.: Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. *Pharmaceuticals*, 9, 4, 2016, 1–15. DOI: 10.3390/ph9040061
- HAGIWARA S., KAWAI K., ANRI A., NAGAHATA H.: Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65, 3, 2003, 319–323.
- HÁJ, F.: Školák Kája Mařík. Kapitola XIII, Kája jede do Prahy – přijímací zkouška. Díl IV. III. Vydání. Občanská tiskárna v Brně, 1930, 96.
- HARMON R. J., SCHANBACHER F. L., FERGUSON L. C., SMITH K. L.: Concentration of lactoferrin in milk of normal lactating cows and changes occurring during mastitis. *American Journal of Veterinary Research*, 36, 1975, 1001–1007.

- CHANETON L., TIRANTE L., MAITO J., CHAVES J., BUSSMANN L. E.: Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 91, 5, 2008, 1865–1873.
- CHAMMURAPIHO ZÁKONÍK: Wikipedie, https://cs.wikipedia.org/wiki/Chammurapiho_z%C3%A1kon%C3%ADk
- CHAMMURAPIHO ZÁKONÍK A PIVO: Wikipedie, <http://www.dudakpraha.cz/clanky-a-oznameni/pivo-a-zname-osobnosti/chammurapiho-zakonik-a-pivo/>
- CHENG J. B., WANG J. Q., BU D. P., LIU G. L., ZHANG C. G., WEI H. Y., ZHOU L. Y., WANG J. Z.: Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 91, 3, 2008, 970–976.
- KADEČKA J., ROZMAN J.: Chov skotu v proměnách času v Čechách se zaměřením na severovýchodní Čechy. ChovServis a.s., Hradec Králové, 2006, 124.
- KOPÁČEK, J.: Situace na trhu s mlékem. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 34, 199, 4, 2023 a, IV–VII.
- KOPÁČEK, J.: Situace na trhu s mlékem. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 34, 200, 5, 2023 b, IV–VI.
- KOPÁČEK, J.: Situace na trhu s mlékem. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 34, 201, 6, 2023 c, III–VI.
- KOPÁČEK, J.: Aktuální trh s mlékem a jeho dynamika - 1. Současná situace ve světovém mlékárenství. PP prezentace, Seminář 24. a 25. 10. 2024, Dny prvovýroby mléka 2023 d, Brněnská přehrada, OREA Resort Santon, Brno, Českomoravská společnost chovatelů a.s.
- KOPÁČEK, J.: Situace na trhu s mlékem. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 35, 202, 1, 2024, III–V.
- KOPUNECZ, P.: *Výsledky kvality nakupovaného mléka v roce 2019 podle analýz bazénových vzorků*. ČMSCH a.s., Hradištko, únor 2020, s. 16.
- KRÓL J., LITWIŃCZUK Z., BRODZIAK A., BARŁOWSKA J.: Lactoferrin, lysozyme and immunoglobulin G content in milk of four breeds of cows managed under intensive production system. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13, 2, 2010, 357–361.
- KUNES R., BARTOS P., IWASAKA G. K., LANG A., HANKOVEC T., SMUTNY L., CERNY P., POBORSKA A., SMETANA P., KRIZ P., KERNEROVA N.: In-Line Technologies for the Analysis of Important Milk Parameters during the Milking Process: A Review. *Agriculture* 2021, 11, 239. DOI: 10.3390/agriculture11030239
- MCGRATH B. A., FOX P. F., MCSWEENEY P. L. H., KELLY A. L.: Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Science and Technology*, 96, 2016, 133–158. DOI: 10.1007/s13594-015-0258-x
- NIERO, G.- THOMAS, S. A.- MOURATIDOU, K.- VISENTIN, G.- DE MARCHI, M.- PENASA, M.- CASSANDRO, M.: Lactoferrin concentration in bovine milk: validation of radial immunodiffusion technique, sources of variation, and association to udder health status. *Italian Journal of Animal Science*, 22, 1, 2023, 230–238.
- ON 57 0534: Oborová norma; Stanovení kysací schopnosti mléka (jogurtový test). MZVŽ ČSR a SSR, Mlékárenský průmysl, koncern Praha, GRT Bratislava, MDT 637.1.001, 1987.
- RAUBERTAS J. K., SHOOK G. E.: Relationship between lactation measures of SCC and milk yield. *Journal of Dairy Science*, 65, 1982, 419–425.
- RENEAU J. K., APPLEMAN R. D., STEUERNAGEL G. R., MUDGE J. W.: Somatic cell count. An effective tool in controlling mastitis. *Agricultural Extension Service*, University of Minnesota, AG-FO-0447, 1983 a 1988.
- RENEAU J. K.: Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. *Journal of Dairy Science*, 69, 1986, 1708–1720.
- SHOOK G. E.: Approaches to summarizing somatic cell count which improve interpretability. *Nat. Mast. Council, Louisville, Kentucky*, 1982, 1–17.

- SLÁDEK, M.: *Výsledky kvality nakupovaného mléka v roce 2023 podle analýz bazénových vzorků*. Českomoravská společnost chovatelů, a.s., Hradištko, 2024, 21.
- SYRŮČEK J., LIPOVSKÝ D., SLÁDEK M. et al.: *Chov skotu v České republice. Ročenka 2023*. ČMSCH a.s. Praha, 2024, 43.
- VALK-WEEBER R. L., ESHUIS-DE RUITER T., DIJKHUIZEN L., VAN LEEUWEN S.: Dynamic Temporal Variations in Bovine Lactoferrin Glycan Structures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 2, 2020, 549–560. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b06762
- WENDT K. et al. (1994): Zu hoher Zellgehalt in der Herdensammelmilch - wie kann geholfen werden? AG Melken und Melktechnik, Informationen WGM, e. V., 1–12.
- WIGGANS G. R., SHOOK G. E.: A lactation measure of somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, 70, 1987, 2666–2672.

Seznam publikací, které předcházely metodice.

Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech:

- HANUŠ O.: Počet somatických buněk – I) Individuální vzorky mléka. Somatic cell count - I) Individual milk samples. ČMSCH a. s., *Fenotyp DKU.CZ, Odborné informace, zprávy a zajímavosti pro chovatele*, duben, 1, 2020 a, 12–17. <https://www.cmsch.cz/CMSCH.cz/media/docs/Fenotyp/FENOTYOP-casopis-DKU.pdf>
- HANUŠ O.: Počet somatických buněk – II) Bazénové vzorky mléka. Somatic cell count - II) Bulk milk samples. ČMSCH a. s., *Fenotyp DKU.CZ, Odborné informace, zprávy a zajímavosti pro chovatele*, listopad, 2, 2020 b, 9–12
- HANUŠ O.: Úvaha nad řešením problému falšování potravin a potravinových surovin, zejména s přihlédnutím k mlékařství. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 30, 177, 6, 2019, XIII–XIV.
- HANUŠ O., BJELKA M., TICHÁČEK A., JEDELSKÁ R., KOPECKÝ J.: Analýza nezbytnosti a účelnosti transformací dat u souborů výsledků některých mléčných parametrů. Substantiation and usefulness of transformations in data sets of analyzed milk parameters. In *Chov a šlechtění skotu pro konkurenceschopnou výrobu: sborník referátů VÚCHS Rapotín*, In *Rearing and breeding of cattle for competitionable production: proceedings of the seminar VÚCHS Rapotín*, 2001, 122–137.
- HANUŠ O., HANUŠOVÁ K., VYLETĚLOVÁ M., KOPEC T., JANŮ L., KOPECKÝ J.: Selected abiotic factors influencing raw cow milk freezing point depression. Vybrané abiotické faktory ovlivňující depresi bodu mraznutí syrového kravského mléka. *Acta Veterinaria Brno*, 81, 1, 2012, 49–55.
- HANUŠ O., JANŮ L., SCHUSTER J., KUČERA J., VYLETĚLOVÁ M., GENČUROVÁ V.: Exploratory analysis of dynamics of frequency distribution of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. Průzkumná analýza dynamiky rozložení četností hodnot ukazatelů kvality syrového kravského mléka v České republice. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, LIX, 1, 2011, 83–100.
- HANUŠ O., JANŮ L., VYLETĚLOVÁ M., KUČERA J.: Research and development of a synthetic quality indicator for raw milk assessment. *Folia Veterinaria*, 53, 2, 2009, 90–100.
- HANUŠ O., JANŮ L., VYLETĚLOVÁ M., MACEK A.: Validace použitelnosti algoritmu relativního syntetického ukazatele kvality syrového mléka (SQSM) pro konzistentní modifikaci farmářské ceny. A validation of algorithm practicability of the relative synthetic raw milk quality indicator (SQSM) for consistent modification of farmer price. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, LV, 5, 2007, 71–82.
- HANUŠ O., NĚMEČKOVÁ I., RYSOVÁ L., LEGAROVÁ V., KOPECKÝ J.: Možnosti identifikace falšování syrového mléka. Possibilities of identification of adulteration of raw milk. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 30, 177, 6, 2019 a, 1–7.
- HANUŠ O., ROUBAL P., KLIMEŠOVÁ M., JEDELSKÁ R., HEGEDŮŠOVÁ Z.: Retrospektivní analýza trendů vývoje doживosti a kvality syrového kravského mléka v České republice. Retrospective analysis of trends in yield and quality of raw cow milk in the Czech Republic. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 30, 172, 1, 2019 b, 4–11.
- HANUŠ O., RYSOVÁ L., NĚMEČKOVÁ I., LEGAROVÁ V., KUČERA J., KLIMEŠOVÁ M., JEDELSKÁ R., KOPECKÝ J., NEJESCHLEBOVÁ L.: Změny technologických vlastností mléka malých přežvýkavců v důsledku falšování mlékem kravským. Changes in the technological properties of small ruminant milk as a result of adulteration by cow milk. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 31, 183, 6, 2020, 4–13.

- HANUŠ O., ŘÍHA J., NEJESCHLEBOVÁ, H., RYSOVÁ L., LEGAROVÁ V., TICHOVSKÝ P., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R.: Změny technologických vlastností mléka a jeho IR spekter při významné redukci počtu somatických buněk. Changes in the technological properties of milk and its IR spectrum with a significant reduction in the somatic cell count. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 32, 189, 6, 2021, 15–23.
- HANUŠ O., TOMÁŠKA M., HOFERICOVÁ M., VYLETĚLOVÁ KLIMEŠOVÁ M., Klapáčová L., JEDELSKÁ R., KOLOŠTA M.: Relationship between freezing point and raw ewes' milk components as a possible tool for estimation of milk adulteration with added water. Vztah mezi bodem mrznutí a složkami syrového ovčího mléka jako možný prostředek pro odhad falšování mléka přidanou vodou. *Journal of Food and Nutrition Research*, 54, 4, 2015, 281–288.
- JANŮ L., HANUŠ O., BAUMGARTNER C., MACEK A., JEDELSKÁ R.: The analysis of state, dynamics and properties of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. Analýza stavu, dynamiky a vlastností ukazatelů kvality syrového kravského mléka v České republice. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 10, 3, 2007, 74–85.
- KEJDOVÁ RYSOVÁ L., LEGAROVÁ V., FORMÁNKOVÁ HERMAN S., NOSKOVÁ A., ALTMANOVÁ Š., NEJESCHLEBOVÁ H.: Využití nukleární magnetické rezonance v mlékárenském výzkumu. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 204, 35/3, 2024, 9–12.
- NAVRÁTILOVÁ P., VORLOVÁ L., BARTÁKOVÁ K., BORKOVCOVÁ I., HANUŠ O., NEJESCHLEBOVÁ H., SAMKOVÁ E.: Laktoferin – multifunkční glykoprotein v mléce. Lactoferrin – multifunctional glycoprotein in milk. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 33, 194, 5, 2022, 1–5.
- NEJESCHLEBOVÁ H., HANUŠ O., BARTÁKOVÁ K., SAMKOVÁ E., VORLOVÁ L., NAVRÁTILOVÁ P., BORKOVÁ M., KUČERA J., HASOŇOVÁ L., HÁLOVÁ K., KOPECKÝ J.: Vybrané analytické a interpretační aspekty obsahu laktoferinu v kravském mléce. Selected analytical and interpretative aspects of lactoferrin content in cow milk. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 34, 196, 1, 2023, 1–7.
- RYSOVA L., CEJNAR P., HANUS O., LEGAROVA V., HAVLIK J., NEJESCHLEBOVA H., NEMECKOVA I., JEDELSKA R., BOZIK, M.: Evaluation of MALDI-TOF MS technology in small ruminants' milk adulteration using raw bovine milk. Hodnocení technologie MALDI-TOF MS při falšování mléka malých přežvýkavců pomocí syrového kravského mléka. *Journal of Dairy Science*, 105, 6, 2022 a, 4882–4894. DOI: 10.3168/jds.2021-21396
- RYSOVA L., LEGAROVA V., PACAKOVA Z., HANUS O., NEMECKOVA I., KLIMESOVA M., HAVLIK J.: Detection of bovine milk adulteration in caprine milk with *N*-acetyl carbohydrate biomarkers by using ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Detekce falšování bovinního mléka v kozím mléce biomarkery *N*-acetyl karbohydrátu pomocí ¹H nukleární magnetické rezonanční spektroskopie. *Journal of Dairy Science*, 104, 9, 2021, 9583–9595. DOI: 10.3168/jds.2020-20077
- SAMKOVÁ E. et al. (CEMPÍRKOVÁ R., HANUŠ O., HASOŇOVÁ L., HLAVÁČEK J., JELEN P., JEŘÁBKOVÁ J., KOPÁČEK J., LUŽOVÁ T., NAVRÁTILOVÁ P., SEYDLOVÁ R., ŠUSTOVÁ K., ŠPIČKA J., VORLOVÁ L., VYLETĚLOVÁ M.): Mléko: produkce a kvalita. Milk: production and quality. Vědecká monografie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. HANUŠ O., VYLETĚLOVÁ M.: 5. Jakostní ukazatele mléka. 5.11. Technologické vlastnosti mléka. 5.11. Milk quality indicators. 5.11. Milk technological properties. 168-177; ISBN: 978-80-7394-383-7, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2012, 240.

Předchozí tematicky relevantní metodiky k problematice stanovení laktoferinu a některých způsobů detekce falšování mléka:

NEJESCHLEBOVÁ H., HANUŠ O., BARTÁKOVÁ K., SAMKOVÁ E., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R.: Postup rychlého stanovení obsahu laktoferinu v mléce rutinní metodou infračervené spektrometrie. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha, Veterinární univerzitou Brno, Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích a Svazem výrobců mléka a.s., Šumperk z 25.11.2024 a 15.01.2025. Datum vydání osvědčení 05.12.2024 (č. SVS/2024/176939-G). ISBN: 978-80-88390-12-1

https://agronavigator.cz/sites/default/files/users/user446/Postup_rychleho_stanoveni_laktoferinu.pdf

RYSOVÁ L., CEJNAR P., HANUŠ O., BOŽIK M., LEGAROVÁ V., NEJESCHLEBOVÁ H., NĚMEČKOVÁ I.: Detekce falšování kozího a ovčího mléka kravským mlékem metodou MALDI-TOF MS. Detection of goat and sheep milk adulteration by cow's milk using the MALDI-TOF MS method. Datum vydání osvědčení 17.05.2022 b, (osvědčení číslo SVS/2022/067167-G.) ISBN: 978-80-213-3154-9. <https://metodiky.agrobiologie.cz/>

RYSOVÁ L., PACÁKOVÁ Z., HANUŠ O., LEGAROVÁ V., HAVLÍK J., MASCELLANI BERGO A., NEJESCHLEBOVÁ H., NĚMEČKOVÁ I.: Detekce falšování kozího mléka kravským mlékem metodou 1H NMR. Detection of goat milk adulteration by cow's milk by 1H NMR method. Datum vydání osvědčení 06.01.2022 c, (osvědčení číslo SVS/2022/003255-G.). ISBN: 978-80-213-3143-3 <https://metodiky.agrobiologie.cz/>

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

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

Za zhotovitele:

Prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.

