



MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ



Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů



# **Možnosti použití doporučených mlékařských analytických metod s potenciálem k identifikaci umělé redukce počtu somatických buněk**

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

## **Zpracovali:**

Oto Hanuš<sup>1</sup>, Hana Nejeschlebová<sup>1</sup>, Veronika Legarová<sup>2</sup>,  
Lucie Kejdová Rysová<sup>2</sup>, Marcela Klimešová<sup>1</sup>, Radoslava Jedelská<sup>1</sup>,  
Jaroslav Kopecký<sup>1</sup>, Ludmila Nejeschlebová<sup>1</sup>

1 Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

2 Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Praha

**ISBN: 978-80-88390-16-9**

**Květen 2026**

## **Vydavatel:**

**Pro:** Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Českou zemědělskou univerzitu

**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, 2026

## **Podíl autorů na tvorbě metodiky:**

25 % Oto Hanuš  
20 % Hana Nejeschlebová  
20 % Veronika Legarová  
15 % Lucie Kejdová Rysová  
5 % Marcela Klimešová  
5 % Radoslava Jedelská  
5 % Jaroslav Kopecký  
5 % Ludmila Nejeschlebová

## **Podíl firem na tvorbě metodiky:**

65 % Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha  
35 % Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Praha

## **Podíl projektů na tvorbě metodiky:**

75 % Výzkumný projekt MZe NAZV ZEMĚ QK21010212  
25 % Podpora na rozvoj výzkumné organizace č. RO1425

## **Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:**

- 1) **Odborník z daného oboru:** Ing. Václava Genčurová Ph.D., pracoviště: Vápenka Vitošov, vedoucí akreditované laboratoře, odborník na analýzy potravin, zemědělských surovin a materiálů a stavebních hmot, dlouhá praxe v mlékařství;
- 2) **Pracovník státní správy:** MVDr. Jana Horňáčková, pracoviště: Státní veterinární správa, Praha – odborník kontroly zdravotních, hygienických a kvalitativních faktorů v potravinářství.

## **Dedikace na projekt:**

Metodika je výsledkem řešení:

- a) Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu MZe NAZV ZEMĚ QK21010212 s názvem: „Vývoj metod pro kontrolu manipulace kvality mléka určeného k dalšímu technologickému zpracování a zajištění jeho autenticity“, jako výsledek QK21010212-V08
- b) Podpory na rozvoj výzkumné organizace č. RO1425

# Obsah

Cíl metodiky.....	4
Nejčastěji použité zkratky: .....	4
Vlastní popis metodiky.....	5
1) Úvod a současný stav .....	5
2) Cíl metodiky vývoje a validace kombinovaných postupů pro detekci rizika použití technologie ARPSB v mlékařské praxi .....	8
3) Vlastní metodika pro posouzení potenciálu analytických postupů k detekci ARPSB v syrovém mléce.....	21
4) Závěr metodiky pro odhad rizika ARPSB .....	21
Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice .....	23
Popis uplatnění metodiky. ....	24
Ekonomické aspekty. ....	24
Seznam použité související literatury.....	25
Seznam publikací, které předcházely metodice. ....	29
Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech: .....	29
Předchozí tematicky relevantní metodiky k problematice některých způsobů detekce falšování mléka: .....	31
Příloha č. 1.....	33
Příloha č. 2 metodiky: .....	37

# 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 doporučení metod do analytické kombinace s potenciálem detekce umělé redukce počtu somatických buněk jako postupu porušujícího autenticitu syrového kravského mléka.

## 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;  
HPLC = vysoce účinná kapalinová chromatografie;  
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 a současný stav

### *Rámcová historie falšování mléka (zvodnění, chemické přídavky, redukce počtu somatických buněk)*

Falšování je obecně rozšířená lidská činnost motivovaná komerčními zájmy, vedoucí obvykle k přisouzení neadekvátní hodnoty za domnělou kvalitu. Nejinak je tomu v mlékařství, se surovinou i potravinami. Poškozována jsou tím tedy zejména kvalitativní hlediska produkce, nezřídka i s možnými, negativními, zdravotními dopady na konzumenta.

Sledování a vyhodnocování kvality syrového mléka pomáhá plnit důležitou společenskou zakázku (BAUMGARTNER et al., 2000; KOPUNECZ, 2019; KOPÁČEK, 2023 a, b, c, d, 2024). Bezpečnost a kvalita mléčného potravinového řetězce jsou důležitými aspekty ochrany veřejného zdraví, jak mimo jiné dokládají i popisy vývoje vyšetřovacích analytických metod a systémů dohledatelnosti rizikových zdrojů (MILLÁN-VERDÚ et al., 2003; HANUŠ et al., 2007, 2009, 2011, 2025; MARTÍNEZ de la VARA et al., 2018; KUNES et al., 2021; NAVRÁTILOVÁ et al., 2024; DLUHOŠOVÁ et al., 2024; KLIMEŠOVÁ et al., 2025).

Mezi první metody falšování mléka a porušování jeho autenticity patřilo zvodnění (KADEČKA a ROZMAN, 2006), aplikované snad již od starověku. Ke kontrole falšování mléka zvodněním byly postupně vyvíjeny metody jako acidobutyrometrické stanovení tuku (dle Gerbera), okoskopická fotometrie (A. F. Donné; laktoskop; MILLÁN-VERDÚ et al., 2003), určení specifické hmotnosti mléka laktodenzitometrem až posléze stanovení sušiny tukuprosté gravimetricky a složek mléka celkem infračervenou spektroskopií (KUNES et al., 2021). Žádná z těchto detekčních metod však nebyla příliš přesvědčivá pro jistý průkaz zvodnění. Vždy šlo o nepřímý podložený důkaz. Větší spolehlivosti docílilo až stanovení bodu mrznutí mléka kryoskopicky (BROUWER, 1981; BAUCH et al., 1993; BUCHBERGER, 1994; BUCHBERGER a KLOSTERMEYER, 1995). Skutečností aktuálně je, že kontrola zvodnění kravského mléka pozbývá na významu, neboť platba kvality mléka je realizována také, mimo jiné, podle obsahu tuku a bílkovin a tak úmyslné falšování pro zisk navýšením objemu postrádá smysl a jev se vyskytuje již řídce, pouze jako důsledek nějaké technologické poruchy při dojení nebo zpracování mléka. Jinak je tomu ovšem u mléka malých přežvýkavců. Důvodem je vyšší, tři až šestkrát, cena litru mléka oproti kravskému. Při velké variabilitě složení koziho a ovčího mléka podle plemen lze ke kontrole použít složky jen omezeně, limity selhávají a např. na Slovensku, kde se mléko ovčí dodává do větších mlékáren (což v ČR absentuje), je možnost zvětšit objem dodávky mléka vodou stále lákavá. Proto byl na Slovensku problém identifikace porušení ovčího mléka vodou před nedávnem řešen. Závěry byly (HANUŠ et al., 2015): - že mléko malých přežvýkavců je vnímáno zdravotně jako vhodná alternativa případných problémů s konzumací mléka kravského; - cena tohoto syrového mléka je výrazně vyšší než mléka kravského; - cena ovčího mléka je faktorem potřeby kontroly jeho případného zvodnění; - zvodnění může představovat technologické a představuje ekonomické riziko pro zpracovatele mléka. Cílem bylo realizovat zpřesnění detekčního limitu bodu mrznutí (BMM) pro zvodnění mléka u ovcí. Použity byly bazénové vzorky. Laktóza tvoří 55,0, 46,95 a 48,18 % BMM u krav, ovcí a koz. Průměr BMM u ovcí byl  $-0,559 \pm 0,029$  °C ( $n = 811$ ). Vysoké korelace byly mezi BMM a složkami:  $-0,228$ ,  $-0,231$ ,  $-0,219$  ( $P < 0,01$ ),  $-0,497$  a  $-0,341$  ( $P < 0,001$ ) pro tuk, bílkoviny, laktózu, sušinu tukuprostou a sušinu celkovou. Korelace mezi BMM (přímá kryoskopie) a jeho ekvivalentem (nepřímé určení) byla  $0,945$  ( $P < 0,001$ ). 1 % zvodnění mléka zvyšuje BMM o  $0,006$  a  $0,0072$  °C u krav a ovcí. Změny (zvýšení) v obsahu

tuku (např. chyba odběru vzorku) o 5,75 % změnily (snížily) BMM u ovcí o 0,005 °C. Odhad měsíčních limitů BMM a složek pro zvodnění mléka u ovcí byl: průměr ( $x$ ) + směrodatná odchylka ( $sd$ )  $\times 1,64$  a  $x - sd \times 1,64$  (95 % jednostranného intervalu spolehlivosti). Limitní rovnice pro BMM podle měsíců (sezóny, laktace) byla:  $y = 0,0044x - 0,5436$ ;  $r = 0,864$ ;  $P < 0,05$ . Byl vytvořen hierarchický model aplikace limitních rovnic BMM a složek pro identifikaci zvodnění mléka ovcí k redukci falešně pozitivních a negativních nálezů podle vztahů složek k BMM. Výsledky jsou prakticky použitelné na Slovensku i v České republice.

Výrazně vyšší cena mléka malých přeživkavců může být důvodem snahy o vylepšení objemu přidavkem mléka kravského. Odhalování tohoto možného falšování je proto významným postupem kontroly kvality (PSATHAS a TZAMALOUKAS, 2017), kterým se zabývaly i předchozí práce a metodiky (RYSOVÁ et al., 2021, 2022 a, b, c). Nejvyužívanější jsou v současné době metody založené na analýze DNA, z nich je nejvíce užívána metoda PCR techniky. Tyto metody rozeznávají jednotlivé druhy mléka, zachycují přídavek od 0,5 nebo 1 %, ale již nejsou schopny identifikovat procentuální zastoupení jednotlivých druhů, což neumožňuje rozeznávat kontaminaci od falšování (BORKOVÁ a SNÁŠELOVÁ, 2005; ZACHAR et al., 2011; DI PINTO et al., 2017; KALOGIANNI, 2018; TSAKALI et al., 2019). Další práce považují infračervené spektrum (IR) falšovaného mléka za biochemický fingerprinting pro přídavky cizorodého druhu mléka do základu jako například ovčí, kozí (malí přeživkavci) nebo buvolí mléko. Proto uvažují o metodě infračervené spektroskopie v celé středové oblasti IR záření se záznamem spektra Michelsonovým interferometrem a Fourierovou transformací při vyhodnocení získaného signálu (MIR-FT) za perspektivní metodu pro možnost detekce falšování mléka, nicméně, obvykle zachycené schopnosti detekce se zatím pohybují kolem 5 nebo i 10 % přídavku cizorodého mléka (NICOLAOU et al., 2010; CIRAK et al., 2018), což sice pro praktickou detekci falšování může stačit, protože méně již nepřináší žádný podstatný ekonomický efekt z této falšovací činnosti, přesto je třeba nalézt metodicky i nižší hladiny rozlišení a kvantifikace.

V roce 2008 celý svět zaujala melaminová aféra falšování mléka v Číně, která se stala jedním z největších potravinových skandálů. Šlo o přídavek chemikálie melaminu s cílem oklamat analytické metody (Kjeldahlova metoda) a přídavkem dusíku zvýšit domněle obsah hrubých bílkovin v mléce. To poškodilo zdraví kojenců (někteří i zemřeli) konzumujících mléčné náhražky a vedlo proto k vývoji nových detekčních metod ke kontrole kvality (SHIMADZU, 2013). Následně u několika odsouzených padly i tresty smrti. Skandál ovlivnil mezinárodní obchod s mléčnými produkty. Přesto se kontaminované produkty později znovu objevily v tržní síti v důsledku nedůsledné likvidace.

V posledním období se v EU včetně ČR poměrně rozšířila separační metoda (centrifugační a filtrační oddělení PSB) pro zdánlivé vylepšování kvality mléka. Pokud jsou však odstraněny jen somatické buňky (nikoliv příčiny mastitidních projevů – prevence a profylaxe onemocnění) a mléko je dodáno, zhoršená kvalita suroviny vlivem mastitidy zůstane velmi pravděpodobně nezměněna. Takové dodávky mohou ohrozit technologické zpracování (na sýr a fermentované mléčné výrobky) a kvalitu mléčného potravinového řetězce vůbec.

### ***Urgentní potřeba studia a vývoje analytických metod odhalování falšování mléka pomocí umělé redukce počtu somatických buněk (ARPSB)***

Výše zmíněná manipulace mléka (ARPSB) není v souladu s platnou legislativou, která za syrové mléko považuje surovinu získanou dojením hospodářských zvířat a také s očekáváním spotřebitele, který je de facto tímto způsobem klamán. ČSN 57 0529 Syrové kravské mléko platná ve své době, dnes neplatná, přesto stále, nepřímým, dílčím způsobem pokračuje prakticky a setrvačně v dodavatelsko-odběratelských smlouvách, stejně jako dnes cechovní normy

(dobrovolný akreditační systém Potravinářské komory České republiky (PKČR): Cechovní norma – Syrové kravské mléko 2016-03-18-0127), obsahovala v preambuli obecné ustanovení: „Z mléka nesmí být před ošetřením v mlékárně nic odebráno a nic přidáno. Znamená to tedy například zákaz používání separátorů v prvovýrobě.“ To zajišťovalo kontrolu autenticity mléčné suroviny. Hlavní opora pak je dnes v evropské potravinové legislativě Nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013 ze dne 17. prosince 2013, která obsahuje klauzuli: „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.“ Uvedené tedy i legislativně, nejen fakticky a z etického pohledu, podporuje hledání efektivních analytických metod identifikace rizika výskytu aplikace technologie ARPSB v praxi, které doposud nebyly známy, pro kontrolu autenticity a zajištění bezpečnosti mléčného potravinového řetězce. Tímto úhlem pohledu je potřebné nazírat na použití technologie ARPSB.

### ***Poruchy sekrece mléka, počet somatických buněk a ARPSB***

Problém výskytu mastitid ve stádech dojníc je obecně trvalý (PYÖRÄLÄ, 2003; HISIRA et al., 2024). Je však nezbytné ho řešit prevencí výskytu mastitid, tedy jejich profylaxí, případně jejich léčbou a nikoliv místy používanou uměle vytvořenou redukcí PSB (ARPSB) v syrovém mléce na bázi centrifugace při dodávce mléka do mlékárny. K účelu ARPSB byly vyvinuty relevantní separační technologie, u kterých se „zvýšením kvality mléka“ při ARPSB také argumentuje. Takový postup může nicméně znamenat četná hygienická (kvalitativní) rizika pro zpracovatelské technologie při výrobě mléčných potravin a je principiálně neetický vůči spotřebitelům mléčných výrobků, neboť může neadekvátně zvyšovat podíl mléka zpracovaného na potraviny od nemocných zvířat.

Produkční poruchy zdraví mléčné žlázy (poruchy sekrece mléka, subklinické a klinické mastitidy) jsou stálým problémem mlékařství (PYÖRÄLÄ, 2003; PITKÄLÄ et al., 2004; ATASEVER a ERDEM, 2009; KVAPILÍK et al., 2014, 2015; BUCEK et al., 2021; ARIKAN et al., 2024; STANEK et al., 2024). HISIRA et al. (2024) uvedli: „Navzdory značnému úsilí mnoha vědců a odborníků na mastitidu nebyla tato nemoc na mléčných farmách vymýcena a zůstává vážným problémem, který způsobuje zemědělcům značné ztráty.“ PSB je dlouhodobě, již od 70. až 80. let minulého století, celosvětově uznávaným ukazatelem zdravotní a hygienické kvality mléčné žlázy dojnice (čtvrté a individuální směsné vzorky mléka), celých stád dojených krav (bazénové vzorky mléka) a syrového mléka pro jeho zpracování v mlékárně. Tato skutečnost je oficiálně podchycena v internacionálních standardech kvality mléka, např. v Nařízení EU č. 1308/2013. Limit kvality je zde  $\leq 400 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ . Tento limit však již odpovídá ztrátě dojivosti minimálně cca 4 % (WENDT et al., 1994). ARIKAN et al. (2024) zmínili, že celková ekonomická ztráta u subklinické mastitidy, jako hlavní příčiny ztrát v chovu, není dána jen ztrátou na produkci mléka, ale vedle nákladů na ošetření také vyřazením mléka krávy v případě antibiotického ošetření. Tento objem odhadli na 41,15, 80,5 a 114,5 l mléka na ošetření v případech mírného, středního a silnějšího onemocnění. Dále ATASEVER a ERDEM (2009) zaznamenali u holštýnských krav v Turecku s průměrem PSB za 10 let  $705 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$  relativní ztráty na denní dojivosti, laktační dojivosti a dojivosti za 305 dní laktace 14,6 až 17,4, 11,6 a 12,8 až 15,4 %.

Dále byly podrobně zpracovány statistické postupy k interpretaci PSB s ohledem na výskyt mastitid a jejich patogenů, ztráty mléka na dojivosti, řízení prevence a léčby poruch sekrece mléka a zvyšování kvality mléka (ALI a SHOOK, 1980; SHOOK, 1982; RAUBERTAS a SHOOK, 1982; RENEAU, 1986; RENEAU et al., 1988; WIGGANS a SHOOK, 1987). Zde byl statisticky odvozen limit individuálního (směsný individuální vzorek mléka v kontrole užitkovosti) PSB pro registraci podezření na výskyt subklinické mastitidy u dojnice v hodnotě  $\geq 283 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ .

Nicméně, skutečně zdravá mléčná žláza krávy má PSB  $\leq 100 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ . Někdy bývá také použit cut-off limit  $200 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$  (BOBBO et al., 2020; ZECCONI et al., 2020). Např. SUMON et al. (2020) zjistili u čtvrtových vzorků mléka krav zebu, že: - infikované čtvrti měly významně vyšší průměrnou hodnotu PSB ( $211 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ ) ve srovnání s neinfikovanými čtvrtěmi ( $33 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ ); - průměrná hodnota PSB byla nejvyšší u intramamární infekce s *Enterobacter* spp. ( $338 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ ), následovaná *Bacillus* spp. ( $319 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ ), koaguláza negativními stafylokoky ( $268 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ ), *Staphylococcus aureus* ( $218 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ ) a *Escherichia coli* ( $201 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ ) a nejnižší u *Pseudomonas aeruginosa* ( $66 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ ).

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

Význam kontrol kvality syrového mléka byl již zmíněn. Nezbytnost kontroly autenticity a kvalita syrového mléka vyplývá především z již zmíněných potravinových standardů (norem):

- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013;
- Cechovní norma – Syrové kravské mléko 2016-03-18-0127 (neávazný systém);
- ČSN 57 0529 Syrové kravské mléko (dnes neplatná, stále odborně významná).

## **2) Cíl metodiky vývoje a validace kombinovaných postupů pro detekci rizika použití technologie ARPSB v mlékařské praxi**

Cílem metodiky je strukturalizace a shrnutí poznatků při hledání efektivních, identifikačních, mlékařských, analytických postupů pro ARPSB. Dále uvést praktický postup pro situaci nezbytnosti použití postupu kontroly autenticity suroviny

### ***Aktuální postup hledání efektivních metod identifikace ARPSB***

#### ***Pracovní hypotézy pro jednotlivé metody***

Před řešením projektu byly pro jednotlivé zahrnuté analytické metody, pro jejich identifikační potenciál (s ohledem na ARPSB), vymezeny pracovní hypotézy, které byly s rozdílnými výsledky (ve smyslu potvrzeno/nepotvrzeno) ověřovány:

- odhad potenciálu identifikace ARPSB pomocí výsledků enzymatických metod (semikvantitativní testy aktivit - kataláza, esteráza, laktátdehydrogenáza – výzkumná hypotéza nepotvrzena) a hodnot laktoferinu v mléce (hypotéza stanovena průběžně pro získání nadějných výsledků, hypotéza potvrzena);
- odhad potenciálu identifikace ARPSB pomocí výsledků průtočné cytometrie (FC) PSB, hypotéza o vlivu ARPSB na průměrnou velikost somatických buněk a tvar frekvenční distribuce PSB – hypotéza nepotvrzena z technických důvodů;
- odhad potenciálu identifikace ARPSB pomocí výsledků spekter infračervené spektroskopie (MIR-FT), hypotéza o vlivu ARPSB na spektrální charakteristiky – hypotéza nepotvrzena z technických důvodů;
- odhad potenciálu identifikace ARPSB pomocí výsledků metody NMR (hmotnostní magnetická rezonance), hypotéza o vlivu ARPSB na charakteristiky NMR – hypotéza dílčí způsobem potvrzena;
- odhad potenciálu identifikace ARPSB pomocí výsledků metody MALDI-TOF, hypotéza o vlivu ARPSB na charakteristiky MALDI-TOF – hypotéza dílčí způsobem potvrzena.

Před ověřováním pracovních hypotéz byla konstruována hypotetická tabulka (Tab. 1) o možném identifikačním významu jednotlivých analytických metod, která však s postupem ověřování hypotéz částečně ztratila ze svého interpretačního významu.

### ***Nedávné výsledky a pokrok v možnostech identifikace ARPSB kombinací vybraných mlékařských analytických metod – abstrakty předchozích souvisejících prací***

#### **Změny technologických vlastností mléka a jeho IR spekter při významné redukci počtu somatických buněk (HANUŠ et al., 2021).**

Artificiální redukce (AR-PSB) počtu somatických buněk (PSB) syrového mléka může ovlivnit jeho vlastnosti z analytického i technologického pohledu. AR-PSB byla pokusně provedena centrifugací u 18 vzorků (2 l každý) původního normálního (bazénového,  $PSB \leq 400 \cdot 10^3 \times ml^{-1}$ ) a abnormálního (bazénového, obohaceného  $PSB > 400 \cdot 10^3 \times ml^{-1}$ ) syrového kravského mléka. Geometrický průměr ( $x_g$ ) PSB původního mléka činil  $505 \cdot 10^3 \times ml^{-1}$  ( $x$ , aritmetický průměr  $850 \pm 845 \cdot 10^3 \times ml^{-1}$ ). Byl tak zřetelně vyšší, než průměr PSB pro ČR (2019 a 2020, 221 a  $230 \cdot 10^3 \times ml^{-1}$ ), což je dáno záměrně metodikou pokusu. AR-PSB snížila PSB ( $P < 0,001$ ),  $x$  z 850 na  $310 \cdot 10^3 \times ml^{-1}$  ( $x_g$ : z 505 na  $163 \cdot 10^3 \times ml^{-1}$ ). Vedle PSB byl snížen logicky obsah tuku, tato redukce byla pokryta korigovaným výpočtem pro další práci. Obsahy ostatních složek mléka, bílkoviny, kasein, laktóza, sušina tukuprostá, se změnily procesem AR-PSB nepatrně. Diference v bodu mrznutí mléka byla relativně malá 0,06 % ( $P > 0,05$ ). Změny fyzikálních a technologických ukazatelů byly většinou nevýznamné. Titrační kyselost (SH) byla významně redukována z 8,0 na 7,86 °SH ( $P < 0,01$ ). Možným důvodem je odvod kyslíčnicku uhličitého při AR-PSB. Kysací schopnost mléka (KSM) překvapivě vzrostla z 26,3 na 29,06 °SH ( $P < 0,001$ ), o 10,5 %. Při procesu recovery PSB z bubnu odstředivky po AR-PSB byly dosaženy hodnoty podobné původnímu mléku ( $P > 0,05$ ) při  $x$  850 a 867 a  $x_g$  505 a  $484 \cdot 10^3 \times ml^{-1}$ . Proces AR-PSB ovlivnil počet celkového počtu mikroorganismů (CPM) relativně málo, i když významně ( $P < 0,05$ ), z  $x_g$  179 226 na 213 206 KTJ  $\times ml^{-1}$ . Celkově vyšší CPM byly v důsledku metodiky (příměs abnormálního mléka). Byly zaznamenány i neočekávané výsledky, možná vlivem nižšího počtu vzorků. Proto je třeba další validace. KSM se zlepšila po AR-PSB, dále se lepšila s rostoucím PSB ( $P < 0,01$  a  $P > 0,05$ ) a to jak v původním mléce, tak po AR-PSB. Očekávána byla setrvalost hodnoty KSM během AR-PSB a pokles s růstem PSB. Hypotetické vysvětlení pro vzrůst KSM po AR-PSB je možnost inhibice jogurtové kultury imunoglobuliny na leukocytech (PSB). U nativního mléka (PSB 172) a vzorku se zvýšeným PSB ( $426 \cdot 10^3 \times ml^{-1}$ ), každý 30 l objemu, snížila procedura AR-PSB výrazně PSB o 58,7 a 35,0 %, tuk jen o 3,1 a 1,6 %. Obsahy ostatních hlavních složek se téměř nelišily. Z porovnání IR spekter lze připustit existenci diferencí pro derivaci kalibrace metody MIR-FT k detekci aplikace postupu AR-PSB v praxi.

Tab. 1 Posouzení intenzity (+) ztráty potenciálu postupu podle hypotézy pro indikaci ARPSB vybranými analytickými mlékařskými metodami v důsledku posupného zmenšování podílu přilítí mastitidního (abnormálního) mléka ošetřeného technologií ARPSB do mléka původního, syrového, kravského, bazénového (normálního, standardního) mléka pro dodávku do mlékárny.

Pořadí podle způsobnosti	Metoda, označení	Postup: srovnání – mléko bez ARPSB (původní) versus s ARPSB	Hypotéza možného principu detekce ARPSB	Intenzita způsobnosti detekce pro celý objem bazénového mléka podrobený ARPSB s ohledem na hypotézu	Intenzita ztráty způsobnosti postupu k detekci s poklesem podílu mléka s ARPSB s ohledem na hypotézu
1.	FC	osciloskopický záznam (PSB, velikost jader)	- snížení průměrné hodnoty velikosti somatických buněk (jejich jader) a zároveň změna charakteristik jejich frekvenční distribuce	++++	++++
2.	MIR-FT	IR spektrum, infračervená spektroskopie	- vliv ARPSB na charakteristiky MIR-FT	+++	++
3.	NMR	magnetická rezonance	- vliv ARPSB na charakteristiky NMR	+++	++
4.	MALDI-TOF	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace, detekce doby letu	- vliv ARPSB na charakteristiky MALDI-TOF	+++	++
5.	HPLC přednostně (nebo MIR-FT) a FC	komparace koncentrace LF a PSB v mléce	- LF bude vysoký pro vysoké PSB a s ARPSB pro výrazný pokles PSB nebude klesat, nebo jen minimálně	++	+
6.	semikvantitativní kolorimetrie, záznam času vyplavení disku (kataláza) a FC	komparace aktivity enzymů (kataláza, esteráza, laktátdehydrogenáza) v mléce a PSB	- aktivita enzymů bude vysoká pro vysoké PSB a s ARPSB pro výrazný pokles PSB nebude klesat, nebo jen minimálně	+	++++

ARPSB = umělé snížení počtu somatických buněk (falšovací technologie pro mléko); FC = průtočná cytometrie (flow cytometry); HPLC = vysoceúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography); IR = infračervený (infrared); LF = obsah laktoferinu; MALDI-TOF = matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (matrix assisted laser desorption/ionization), v kombinaci s detektorem doby letu (time-of-flight); MIR-FT = technologie infračervené (IR) spektroskopie mléka s celým IR spektrem pomocí Michelsonova interferometru a s využitím Fourierových transformací; NMR = magnetické nukleární rezonance na bázi protonové hmotnostní spektroskopie; PSB = počet somatických buněk. Hypotetický kvalifikovaný odhad, na základě zkušenosti z experimentů během projektu.

Tab. 4 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 $500 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ .	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 $100 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ . PP, KO = 7.
Velké stádo, více než 300 dojnic, s vyšším promořením SM (nad 30 %) např. PSB bez selekce mléka cca $500 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ .	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 $100 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ . 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 $300 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ .	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 $500 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ .	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 $300 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ .	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 $500 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ .	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 $300 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ .	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 = artifiční redukce počtu somatických buněk; KO = kvalifikovaný odhad; PP = pořadí pravděpodobnosti; PSB = počet somatických buněk; SM = subklinická mastitida.

## **Obsah laktoferinu stanovený v kravském mléce pomocí HPLC a střední infračervené spektrometrie - vztah ke zdraví vemene a potenciál pro detekci falšování mléka (NEJESCHLEBOVÁ et al., 2025).**

Laktoferin (LF) je multifunkční glykoprotein, který je mimo jiné spojován se zdravím vemene dojnic. Pozitivní korelace LF a počtu somatických buněk (PSB) byla zmíněna již dříve. Znalost obsahu LF v mléce má proto v mlékárenském průmyslu velký potenciál. Cílem bylo vyvinout kalibrační model pro stanovení LF rychlou nepřímou metodou střední infračervené spektrometrie (MIR-FT; LF MIR-FT). Jako referenční metoda byla použita iontově-párová reverzní fázová vysoceúčinná kapalinová chromatografie (HPLC; LF HPLC). Dvě sady individuálních vzorků mléka, sada A (n = 120) a sada B (n = 91), byly odebrány na pěti mléčných farmách v České republice. Zatímco odběr vzorků sady B byl náhodný, v sadě A byly charakteristiky mléčných indikátorů záměrně ovlivněny tak, aby se zvýšila pravděpodobnost výskytu subklinické mastitidy. Postup výběru přibližně 2/3 vzorků mléka s PSB nad 300 tis./ml se ukázal jako účinný pro zajištění větší variability LF v souboru. Finální kalibrační sada (n = 205) byla získána sloučením sad A a B a vyřazením 6 odlehlých hodnot. Pro vyvinutý kalibrační model (MIR-FT) bylo dosaženo koeficientu determinace křížové validace 0,5887 a standardní chyby křížové validace 67,33 mg/l. Model by proto měl poskytovat dobrý odhad obsahu LF v mléce. U vzorků sady C byl také zkoumán vztah některých parametrů mléka - obsahu tuku, hrubého proteinu (bílkovin), kaseinu, monohydrátu laktózy (laktóza), sušiny tukuprosté (STP), celkové sušiny (SC), močoviny, volných mastných kyselin (VMK), kyseliny citronové (KC), PSB, elektrické vodivosti (EK) a bodu mrznutí mléka (BMM). Několik parametrů mléka (PSB:  $r = 0,450$ , tuk:  $r = -0,155$ , laktóza:  $r = -0,364$ , močovina:  $r = -0,435$ , VMK:  $r = 0,621$ , KC:  $r = -0,246$ , EK:  $r = 0,442$ ) korelovalo s LF MIR-FT z hlediska změn, ke kterým může dojít při mastitidě. Korelace byly podobně silné, když byl LF stanoven pomocí referenční metody HPLC. Tím byl potvrzen potenciál MIR-FT pro predikci zdraví mléčné žlázy u dojnic. Dále byla prozkoumána možnost využití obsahu LF v mléce k detekci umělého snížení PSB centrifugací mléka, což je nelegální praxe používaná na některých mléčných farmách. Byly získány dvě sady vzorků mléka (n = 20 a n = 68), obě sestávaly z normálního mléka z tanků a mléka z tanků s přidavkem abnormálního mléka dojnic v České republice. Centrifugace mléka způsobila pouze minimální změnu (maximálně 3,27 %) v obou metodách LF HPLC i LF MIR-FT, zatímco PSB se snížil téměř o 50 %. Toto zjištění má potenciál pro použití obsahu LF jako indikátoru umělého snížení PSB v mléce centrifugací (ARPSB).

## **Postup rychlého aproximačního odhadu obsahu lysozymu v mléce rutinní metodou infračervené spektrometrie (HANUŠ et al., 2025; CM 47).**

Metodika je zaměřena na metodu aproximačního odhadu obsahu lysozymu v kravském mléce pro účely rozšíření servisního spektra analýz rutinních mléčných laboratoří k praktickému doplnění informací o zdravotním stavu mléčné žlázy především pro poradenskou službu ke kvalitě mléka. Výstupem je kalibrační model nepřímé metody MIR-FT pro odhad lysozymu v mléce podle výsledků referenční metody HPLC. Korelace metodou PLS pro Lys mezi metodami vysoceúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a infračervené spektroskopie (MIR-FT) činil 0,507. To není příliš slibné. Jen 25,7 % variability Lys ve výsledcích MIR-FT je tak determinováno variacemi ve výsledcích HPLC. Proto je takový případný výsledek jen velmi přibližným odhadem obsahu Lys v kravském mléce. Dále metodika při implementaci podporuje kvalifikaci personálu mléčných laboratoří.

## **Vybrané mastitidní ukazatele jako příznaky podezření na neoprávněné snížení počtu somatických buněk v syrovém kravském mléce (HANUŠ et al., 2025; CM 48).**

Metodika je zaměřena na postup kontroly kvality syrového, kravského, bazénového mléka pro indikaci rizika podezření na použití nelegální technologie umělé redukce počtu somatických buněk (ARPSB). ARPSB je nežádoucí z důvodů legislativních, zdravotních a etických. Postup podporuje autenticitu syrového mléka a bezpečnost mléčného potravinového řetězce. Aplikací studovaných 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 praktiky. Tato situace nastává:

- při záchytu koncentrace LF v syrovém kravském mléce  $> 250$  mg/l;
- při souběžném záchytu PSB  $\leq 350$  tis./ml.

Postup je nový, doposud analytické metody indikace ARPSB nebyly známé. Ačkoliv je ARPSB nelegální, postup sám zlepšil vždy kysací schopnost mléka (KSM):

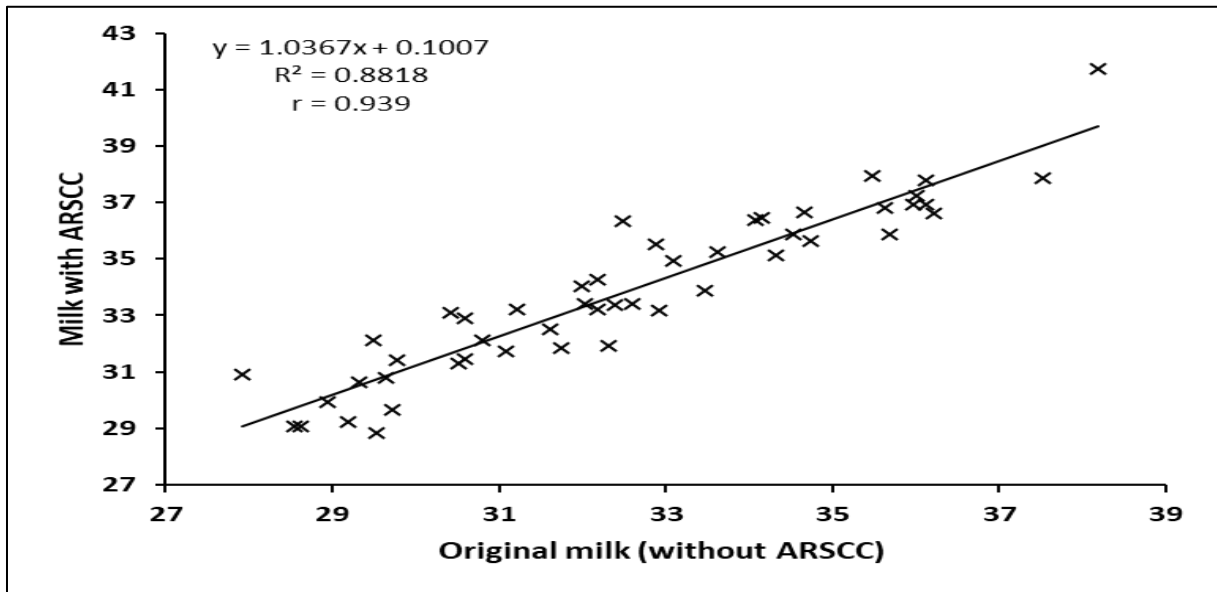
- pro původní mléko byl průměr KSM  $32,51 \pm 2,6$  °SH, vx 8,0 % (n = 49);
- pro mléko po ARPSB byl průměr KSM  $33,8 \pm 2,88$  °SH, vx 8,5 % (n = 49);
- rozdíl v KSM byl  $1,29 \pm 1,0$  °SH, t = 9,07, P < 0,001.

Korelace mezi stanovením LF metodou referenční (HPLC) a nepřímou (MIR-FT) byla 0,767, P < 0,001. Korelace mezi zdravotně významnými složkami mléka byly: - log PSB  $\times$  LF (HPLC) 0,578, P < 0,001; - LF (HPLC)  $\times$  laktóza -0,451, P < 0,001. Při indikaci rizika ARPSB bude potřebné využít dále i kombinace více dalších postupů pro zvýšení pravděpodobnosti správné indikace.

## **Vliv umělé redukce počtu somatických buněk, jako porušení autenticity, na ukazatele kvality mléka (HANUŠ et al., 2025).**

Počet somatických buněk (PSB) v syrovém mléce je významným ukazatelem zdravotní a hygienické kvality. Umělé redukce PSB (ARPSB) v mléce, pro zdánlivé vylepšení kvality mléka z komerčních důvodů, je nežádoucím jevem a porušením autenticity jak ve faktickém slova smyslu, tak legislativně. Je třeba vyvinout analytické metody pro identifikaci ARPSB stejně jako posoudit vlivy, které ARPSB na mléko může mít. Cílem práce bylo kvantifikovat vlivy ARPSB na kravské mléko jako potravinovou surovinu. Uvedené výsledky jsou jedny z prvních k danému problému. Syrové bazénové kravské mléko bylo vzorkováno ve dvou pokusech, vždy po celý rok (2012 – 2022 a 2023 – 2024, n = 66 a 53) od stád krav plemen České strakaté a Holštýn, 1 : 1. ARPSB v pokusu 1. (n = 66) mírně snížila obsah tuku, v pokuse 2. (n = 53) ne, jinak byly mléčné ukazatele s výjimkou PSB téměř (1.) a zcela (2.) identické. Všechny vzorky byly negativní na výskyt reziduí inhibičních látek. ARPSB za uvedených technologických podmínek snížila PSB (1.) ze  $772 \pm 906$  na  $376 \pm 630$   $10^3 \times \text{ml}^{-1}$ , o -51,3 % (P < 0,001) a (2.) z  $592 \pm 798$  na  $304 \pm 468$   $10^3 \times \text{ml}^{-1}$ , o -48,5 % (P < 0,001). Za těchto okolností se zlepšila kysací schopnost mléka (KSM; 1.) z  $28,52 \pm 4,72$  na  $31,0 \pm 4,65$ , o 8,66 % (P < 0,001) a (2. Obr. 1) z  $32,51 \pm 2,61$  na  $33,8 \pm 2,88$ , o 3,97 % (P < 0,001). Pevnost sýreniny byla lepší u PSB  $\leq 400$   $10^3 \times \text{ml}^{-1}$  oproti vyšším PSB o 5,26 % (P < 0,001). Přesto není možné, z hygienických a zdravotních důvodů, připustit takové mléko k lidské spotřebě a je nezbytné hledat efektivní identifikační analytické metody pro ARPSB.

Obr. 1 Vztah KSM v původním mléce a v mléce po ARPSB (°SH; ARSCC), n = 49, r = 0,939, P < 0,001.



Original milk (without ARSCC) = Původní mléko (bez ARPSB); Milk with ARSCC = Mléko s ARPSB.

### **Možnosti detekce falšování mléka redukcí počtu somatických buněk různými metodami (HANUŠ et al., 2025).**

V práci je uveden stav hledání analytické metody s potenciálem pro identifikaci umělé redukce počtu somatických buněk (ARPSB) v mléce jako nelegální praktiky manipulace se syrovým mlékem s porušením jeho autenticity. Je zmíněna nepotvrzená hypotéza pro mléčné enzymy jako indikátory ARPSB. Studium probíhá v oblasti hypotéz možných změn ve spektrech u infračervené spektroskopie (MIR-FT) a ve frekvenční distribuci (průměr a tvar) počtu somatických buněk (PSB) prostřednictvím ARPSB. Jako způsobitelná k identifikaci ARPSB je uvedena kalkulací získaná metoda komparace hodnot laktoferinu (LF) a PSB po ARPSB. Tato situace nastává: - při zachytu koncentrace LF v syrovém kravském mléce > 250 mg/l; - při souběžném zachytu PSB ≤ 350 tis./ml. Jako další možnost s potenciálem 85 % spolehlivosti je zmíněna také nová polská metoda (**Warsaw University of Life Sciences, 2025**) vyhodnocení mikroskopického obrazu mléka prostřednictvím AI po ARPSB. Zde se předpokládá změněný obraz centrifugací poškozených fosfolipidů membrán tukových globulí. Je zřejmé, že k případnému potvrzení podezření z použití technologie ARPSB v praxi bude zatím potřebné kombinovat více doporučovaných analytických postupů.

Uvedené abstrakty z vývoje prací poskytly podklady pro korektury pracovních hypotéz a usměrnily pokračování výzkumné a vývojové práce.

### ***Doplňkové metodické i výsledkové informace ze souběžného průběhu řešení projektu***

### **Metody a výsledky rozšířeného hledání identifikačních metod pro ARPSB**

Technické parametry centrifugační ARPSB jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2 Technické parametry provedení centrifugační ARPSB v syrovém mléce prostřednictvím klasické, malé, průtočné, mlékařské odstředivky historického typu konstrukce Gustaf de Laval s talířovým bubnem.

Parametr	Hodnota
Počet talířů v bubnu	12
Počet otáček bubnu za minutu	11 000
Efektivní poloměr talíře (středního disku, vzdálenost středu odstředovaného materiálu od středu rotace) v mm	25
Bezrozměrná relativní centrifugační síla (zrychlení vyvolané rotací, násobek gravitačního zrychlení (g)) pro aplikovaný materiál	3 500
Bezrozměrná relativní centrifugační síla na maximálním bubnovém poloměru	7 000

Pro ARPSB (n = 66) byly použity bazénové vzorky mléka normálního a bazénové vzorky mléka s přidavkem mléka abnormálního (individuální mléko s vyšším PSB ( $> 900 \text{ } 10^3 \text{ ml}^{-1}$ , subklinická mastitida) v objemu 30 litrů na vzorek od čtyř stád dojnic dvou plemen (H a CF v poměru 1 : 1) během celé kalendářní sezóny. Obsah tuku byl po centrifugaci zachován. PSB byl snížen (Tab. 3) o 48,5 % (v hodnotách aritmetických průměrů). Jinak byl obsah složek v podstatě zachován, difference oproti původnímu mléku byly relativně v rozsahu od 0,08 do -3,19 % (L, M), tedy prakticky zanedbatelné. Mléka, PM a ARPSB, z hlediska složení, je možné považovat za identická, vyjma PSB. To bylo cílem postupu úpravy vzorků mléka.

Tab. 3 Složení mléka před (původní mléko) a po ARPSB (n = 66) a relativní rozsah změn (100 % původní mléko).

MU	Jednotka	Mléko	x	d	d %
T	%	PM	3,96		
T	%	ARPSB	3,96	0,008	0,2
HB	%	PM	3,52		
HB	%	ARPSB	3,52	0,003	0,09
K	%	PM	2,84		
K	%	ARPSB	2,83	-0,008	-0,28
L	%	PM	4,81		
L	%	ARPSB	4,81	0,004	0,08
STP	%	PM	9,02		
STP	%	ARPSB	9,03	0,011	0,12
SC	%	PM	13,79		
SC	%	ARPSB	13,81	0,012	0,09
M	$\text{mg} \times 100 \text{ ml}^{-1}$	PM	22,27		
M	$\text{mg} \times 100 \text{ ml}^{-1}$	ARPSB	21,56	-0,711	-3,19
VMK	$\text{mmol} \times 100 \text{ g}^{-1}$	PM	0,575		
VMK	$\text{mmol} \times 100 \text{ g}^{-1}$	ARPSB	0,579	0,004	0,7
KC	%	PM	0,191		
KC	%	ARPSB	0,19	-0,001	-0,52
PSB	$10^3 \times \text{ml}^{-1}$	PM	592		
PSB	$10^3 \times \text{ml}^{-1}$	ARPSB	304	-287	-48,5
log PSB	-	PM	2,532		
log PSB	-	ARPSB	2,1976	-0,3344	-

T = obsah tuku; HB = obsah hrubých bílkovin; K = obsah kaseinu; L = obsah monohydrátu laktózy; STP = obsah sušiny tukuprosté; SC = obsah sušiny celkové; M = obsah močoviny; VMK = obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku; KC = koncentrace kyseliny citronové; PSB = počet somatických buněk; log PSB = logaritmus PSB při základu 10; PM = původní mléko, n = 66; ARPSB

= artifiální redukci počtu somatických buněk, n = 66; MU = mléčný ukazatel; x = aritmetický průměr; d = průměrný rozdíl (diference, aritmetický průměr: ARPSB - PM); d (%) = relativní průměrný rozdíl, kde 100 % = PM.

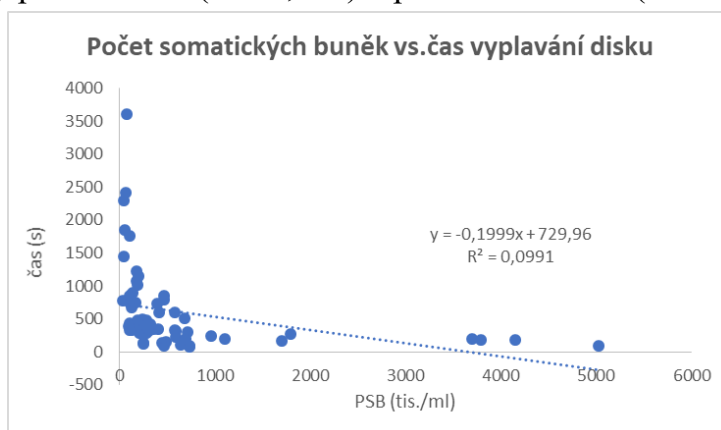
## Aktivita enzymů

Byla předpokládána vysoká aktivita enzymů (kataláza, esteráza, laktátdehydrogenáza) při vysokém PSB, přičemž při použití ARPSB (pokles PSB o cca 50 %) tato aktivita v materiálu zůstane zachována při nízkém PSB (pod cca 300 tis./ml). Tzn., nebude klesat, nebo jen minimálně (o přímou vazbu na neutrofilů). Použité testy tento předpoklad většinou nepotvrdily, kdy aktivita enzymů poklesla relevantně s počtem buněk. Testy tak jen potvrdily svoji analytickou specifikaci a bylo zjevné, že část aktivity enzymů při ARPSB odchází na membránách odstraněných somatických buněk. Také mohly být použité semikvantitativní testy nedostatečně citlivé pro daný účel. Nicméně, souběžně bylo prokázáno (abstrakty výše, již uvedené; NEJESCHLEBOVÁ et al., 2025), že tuto roli může, namísto aktivity enzymů, s analogickou hypotézou, sehrát koncentrace laktoferinu v mléce. To nakonec poskytlo základ jednomu z použitelných postupů (HANUŠ et al., 2025; CM 48). Význam ověření aktivity enzymů pro cíl metodiky opadl, stal se slepou uličkou:

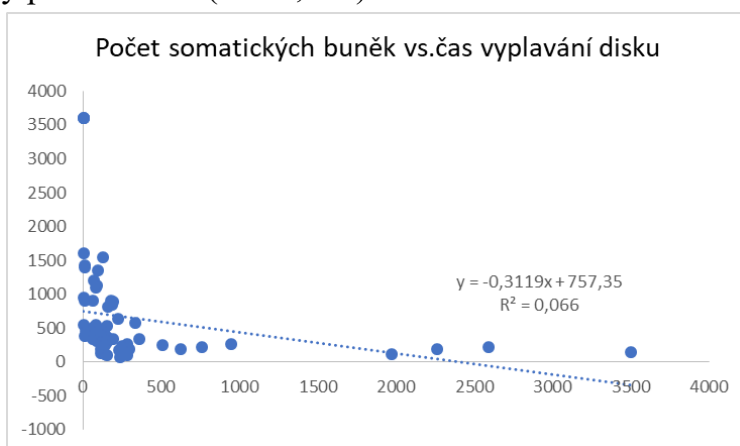
- aktivita některých nativních enzymů mléka je úzce spjata se zdravotním stavem mléčné žlázy. U aktivity některých enzymů (např. kataláza, laktátdehydrogenáza, esteráza) byly zjištěny korelace s počtem somatických buněk (PSB). V praxi mlékařství lze zaznamenat příležitostně aktivitu vedoucí k falšování suroviny prostřednictvím nežádoucího snížení PSB, resp. artifiální redukce PSB (ARPSB). Navržená hypotéza identifikace ARPSB prostřednictvím stanovení aktivity enzymů a srovnáním k PSB je: odstředěním mléka dojde ke snížení PSB (ARPSB), aktivita enzymů nebude tímto ošetřením výrazněji ovlivněna. U falšovaných vzorků tak lze předpokládat PSB nižší než 400 tis./ml a současně vysokou aktivitu enzymů. Při ověřování bylo odstředěno 64 vzorků mléka. U původních i odstředěných vzorků mléka byl současně stanoven PSB průtokovou cytometrií přístrojem Somacount 300 (Bentley Instruments Inc., Chaska, Minnesota, USA) a přístrojem DeLaval Cell Counter a aktivita enzymů katalázy, laktátdehydrogenázy a esterázy;
- byla stanovena aktivita katalázy: enzym kataláza rozkládá peroxid vodíku na O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Disk namočený v mléce po vhození do zkumavky obsahující peroxid vodíku klesne ke dnu, avšak v důsledku kyslíku vznikajícího rozkladem peroxidu vodíku je opětovně vynesena na hladinu. Čas, za který tento jev nastane, je nepřímě úměrný aktivitě katalázy v mléce. Na disky o průměru 6 mm bylo nanášeno 15 µl syrového mléka. Následně byly disky vhozeny do zkumavky s obsahem 5 ml 3% peroxidu vodíku v Tris HCl (Sigma Aldrich), pH 7,2. Byl zaznamenán čas, který uplynul mezi okamžikem vhození disku do zkumavky a jeho vyplaváním na hladinu. Výsledky pro katalázu jsou na Obr. 2 a 3;
- byla stanovena aktivita laktátdehydrogenázy v mléce (Uddercheck). Reagenční podložka testovacího proužku obsahuje imobilizovaný substrát L-laktát. V sérii spřažených reakcí je L-laktát oxidován enzymem laktátdehydrogenáza (LDH) a současně je redukován indikátor nitrotetrazoliová modř na fialový formazan. Intenzita fialové barvy je úměrná koncentraci LDH v mléce. L-laktát + NAD<sup>+</sup> ↔ pyruvát + NADH+H<sup>+</sup>, postup podle návodu výrobce;
- byla stanovena aktivita esterázy v mléce (PortaSCC Quick Test). V důsledku chemické reakce barviva na testovacím proužku a enzymu esterázy v mléce se proužek barví modře. Intenzita zbarvení je úměrná aktivitě esterázy v mléce. Postup podle návodu výrobce;

- podle dosažených výsledků se platnost hypotézy potvrdila pouze částečně pro katalázu (Obr. 2 a 3) a laktátdehydrogenázu, jejichž aktivita odstředěním mléka (PSB) výrazněji neklesá. Vlastní metody použité k detekci aktivity těchto enzymů se však vzhledem k malé citlivosti nejeví jako vhodné pro účel detekce ARPSB. Stanovení aktivity katalázy a laktátdehydrogenázy tak může mít potenciál pro další testování, pokud budou použity citlivější kvantitativní metody. Pro esterázu se potom hypotéza zcela nepotvrdila, neboť její aktivita po ARPSB klesala úměrně PSB. Další podrobnější informace jsou obsahem přílohy č. 1 metodiky.

Obr. 2 Výsledky pro katalázu ( $r = -0,315$ ) v původním mléce (bez ARPSB).



Obr. 3 Výsledky pro katalázu ( $r = -0,257$ ) v mléce s ARPSB.

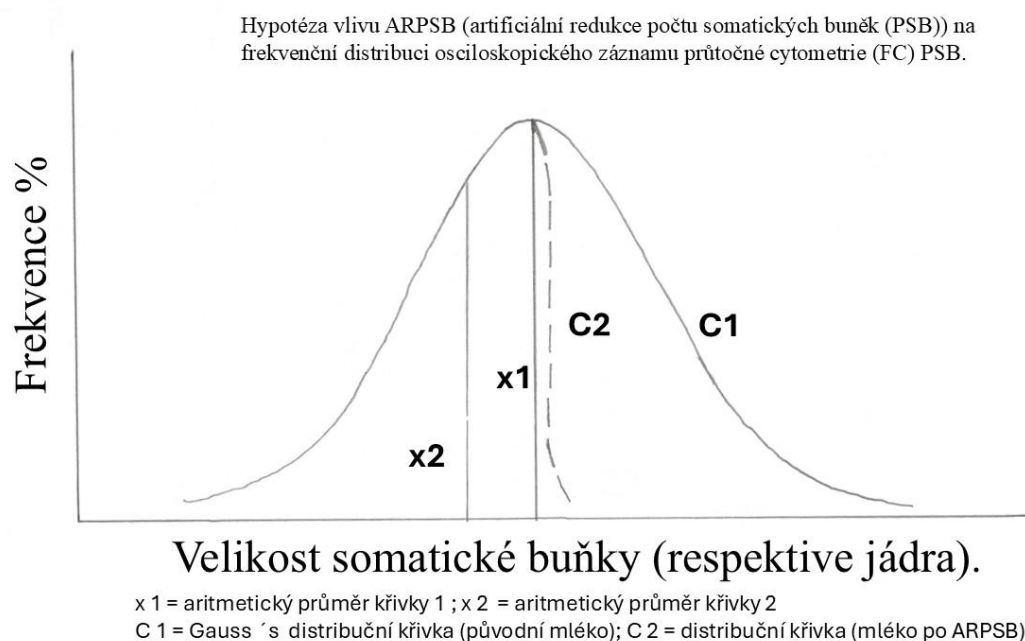


### Distribuce PSB, hypotéza průtočné cytometrie pro ARPSB

Bylo předpokládáno, že výška elektronického, osciloskopického impulsu (píku) somatické buňky v průtočné cytometrii (FC) je funkcí velikosti této buňky, resp. jejího jádra. Hypotéza průtočné cytometrie mléka k její způsobilosti odhadu ARPSB podle předpokládaného snížení průměrné hodnoty velikosti somatických buněk (resp. jader leukocytů;  $x_2$  versus  $x_1$ ) oproti běžným poměrům v kravském mléce a zároveň souběžných změn charakteristik jejich frekvenční distribuce ( $C_2$  versus  $C_1$ ) je uvedena na Obr. 4. Tato hypotéza byla ověřována. Ověřování může bazírovat na analýze 1., 3. a 4. základního statistického momentu, tedy střední hodnoty (průměru), šikmosti a špičatosti (Gaussovy křivky), ale také na nějakém jiném typu analýzy obrazu frekvenční distribuce dat. Nicméně, tato hypotéza může logicky velmi pravděpodobně dobře fungovat, projde-li ošetřením ARPSB celý objem dodávaného mléka ke zpracování. V případě přilítí menšího podílu mléka s ošetřením ARPSB v praxi do většího

objemu původního mléka (velmi pravděpodobně), může být identifikační potenciál této hypotézy a metody mnohdy i značně umenšen. Bohužel z technických důvodů nebylo možné platnost hypotézy prokázat.

Obr. 4 Grafické znázornění principu pokusné hypotézy ověření potenciálu průtočné cytometrie (FC) mléka k identifikaci ARPSB.



### Metody NMR a MALDI-TOF

V rámci studie (KEJDOVÁ RYSOVÁ et al., 2025) bylo odebráno 56 běžných vzorků bazénového kravského mléka ze čtyř farem (plemeno dojnic Holštýn a České strakaté v poměru 2 : 1), včetně kontrolních vzorků pocházejících od stád ykazujících nízký výskyt subklinické mastitidy i přídavků mléka mastitidního. Všechny vzorky byly podrobeny ARPSB (n = 112 (2 × 56)), původní mléko a párové ekvivalenty falšovaného mléka). Následně byla provedena fyzikálně-chemická analýza. Pro detailní analýzu struktury a dynamiky metabolitů v mléku byla použita technika nukleární magnetické rezonance (NMR) s využitím jednorozměrného experimentu *noesypr1d*. Získaná data byla statisticky zpracována diskriminační analýzou založenou na metodě částečných nejmenších čtverců (PLS-DA). Bylo zjištěno, že model PLS-DA nedokázal s dostatečnou přesností odlišit vzorky mléka před a po centrifugaci, což naznačuje, že tento technologický zásah neovlivňuje nízkomolekulární profil mléka. Naproti tomu klasifikace dle PSB při hranici PSB  $400 \cdot 10^3 \text{ ml}^{-1}$  dosáhla přesnosti 74,5 %, při striktnějším vymezení skupiny vzrostla přesnost na 81,2 %. Ještě vyšší klasifikační přesnost byla pozorována při použití nižšího prahu PSB  $200 \cdot 10^3 \text{ ml}^{-1}$ , a to 84 %. Zahrnutí doplňkových parametrů (obsah laktózy, pH, vodivost atd.) nepřineslo významné zlepšení predikce. Z výsledků vyplývá, že NMR je schopna zachytit sekundární metabolické stopy zánětlivých procesů, i když byl vzorek mléka ošetřen technologií ARPSB.

V navazující studii bylo hledáno zlepšení těchto výsledků. Byl dále zhodnocen potenciál protonové nukleární magnetické rezonance ( $^1\text{H}$  NMR) spektroskopie v kombinaci s chemometrickým modelováním k detekci umělého snížení PSB v kravském mléce způsobeného centrifugací. Vzorky syrového mléka (n = 56) pocházející ze čtyř českých

mléčných farem a dvou plemen byly analyzovány před a po centrifugaci (ARPSB), která dosáhla průměrného relativního snížení SCC o 52,2 %. Byly hodnoceny mléčné ukazatele, včetně PSB, elektrické konduktivity, kyselosti pH, bodu mrznutí a laktózy. Tyto byly použity jako doplňkové proměnné spolu se spektrálními daty  $^1\text{H}$  NMR. Model GLM-Lasso pro klasifikaci ukázal nejvyšší efektivitu předpovědi s věrohodností 92 %, když byla zohledněna limitní hodnota PSB  $200 \cdot 10^3 \text{ml}^{-1}$ . Další modely byly méně spolehlivé. Výsledky ukazují, že  $^1\text{H}$  NMR spektroskopie v kombinaci s GLM-Lasso může sloužit jako nepřímý analytický nástroj pro ověřování nekonzistence mezi vykazovaným PSB a biochemickým profilem mléka. Tím je podpořena detekce neoprávněných manipulačních technologií jako je ARPSB.

Byla provedena také studie potenciálu metody MALDI TOF k možnostem detekce ARPSB (LEGAROVÁ et al., 2026; v publikačním procesu). Experimentální analýza ( $n = 68$  vzorků syrového jravského bazénového mléka) prokázala snížení PSB v průměru o  $45,9 \pm 11,6$  %. K identifikaci změn v peptidovém profilu v rozsahu 500–4000 Da byla použita metoda MALDI-TOF MS. Ačkoli nebyly detekovány žádné unikátní píky specifické pro falšované vzorky, korelační analýza odhalila významné vztahy mezi intenzitou specifických peptidů a hodnotami SCC. Významná pozitivní korelace byla nalezena u píků v oblasti  $m/z$  2922 Da ( $r = 0,69$ ), ale i u dalších. Výsledky naznačují, že sledování kvantitativních změn v intenzitě specifických peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie mohou být také jedním z nástrojů pro detekci ARPSB a podporou jeho technologické i zdravotní bezpečnosti.

### ***Diskuse k průběžně zjištěným skutečnostem kolem vývoje metod identifikace ARPSB***

Na téma vlivu ARPSB (byla nalezena pouze jedna práce) na technologické vlastnosti mléka CARMO et al. (2024) zjistili, že mléko s  $\text{PSB} \leq 200\,000$  v 1 ml vykazovalo vyšší výtěžnost v sýrařství a ačkoli centrifugace a mikrofiltrace snížily obsah mléčného tuku (centrifugace z 3,3 na 2,9 %), celkové sušiny (centrifugace z 11,8 na 11,27 %) a PSB (centrifugace z 221 na  $122 \cdot 10^3 \times \text{ml}^{-1}$ ), tyto procesy neovlivnily výtěžnost čerstvého sýra. Toto zjištění však bylo uděláno při nižších hladinách PSB.

Jak již bylo potvrzeno průběžně (v abstraktech a doplňkových informacích), vzorky po ARPSB byly, vyjma PSB, identické s původním mlékem. Při ověření vlivu na kysací schopnost mléka (KSM, jogurtový test; J;  $n = 56$ ) byla 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 %.

ARPSB, jako falšování suroviny, vlivem centrifugačního procesu, poškozují tukové globule a uvolňuje obalové fosfolipidy do mléka (GOLEBIEWSKI et al., 2025; GWARDYS et al., 2025). Tento přístup proto také pracuje s hypotézou identifikace ARPSB. Uvolněný tuk může být problémem a příčinou defektů kvality při technologickém zpracování mléka, včetně porušení trvanlivosti mléčných výrobků. Mikroskopický snímek vyhodnocený algoritmy neuronové sítě prostřednictvím AI umožňuje identifikovat ARPSB. Účinnost detekce přesahuje 85 % (GOLEBIEWSKI et al., 2025). Rozsah použití ARPSB v Polsku, stejně jako v ČR, není přesně znám, ale byl odhadnut na 10 – 15 %. Tento údaj však neidentifikuje, resp. nespecifikuje, zda se jedná o rozsah dodávek syrového mléka do mlékáren, které v celkovém objemu před dodávkou prošly přes technologii ARPSB, vedle takto neošetřeného mléka, nebo se jedná o objem mléka v každé dodávce podrobený ARPSB. To může být poměrně zásadní pro způsobilost identifikace ARPSB, pro všechny testované metody, z titulu zmíněných

mísících (ředicích; poměry přilítí ošetřeného mléka do neošetřeného) efektů. Tyto mohou metodicky komplikovat efektivitu prokazování ARPSB (HANUŠ et al., 2025, CM 48; Tab. 4).

Ve většině našich zpracovaných jogurtů byl po ARPSB pozorován ve vyšší míře výskyt žlutých tukových oček (průměr cca 0,1 - 0,2 mm) na povrchu výrobku. Tento jev svědčí o existenci vyšší míry uvolněného tuku a tedy i volných mastných kyselin. To ovšem může limitovat trvanlivost relevantního mléčného výrobku. Protože tento fenomén nebyl nijak exaktně změřen, resp. kvantifikován, lze ho onačit pouze za výsledek pozorování ze zkušenosti. Tento poznatek je však v souladu s polskou metodikou kontroly ARPSB (GOLEBIEWSKI et al., 2025; GWARDYS et al., 2025), s předpokladem porušení integrity obalů tukových kuliček v důsledku falšování mléka. Také jogurt s vyšším PSB měl významně vyšší ( $P < 0,05$ ) obsah volných mastných kyselin (FERNANDEZ et al., 2007), jako neklamný příznak iniciace lipolýzy.

Ačkoliv je tedy ARPSB nelegální, postup sám vždylepší (zvýší) kysací schopnost mléka (KSM), přibližně o 4 % ( $P < 0,001$ ; HANUŠ et al., 2025) a korelační koeficient mezi KSM v původním mléce a v mléce po ARPSB byl 0,939 ( $n = 49$ ;  $P < 0,001$ ). Na druhé straně, při manuální tradiční malofaremní produkci jogurtů způsobuje ARPSB významné vizuální zvýšení výskytu žlutých tukových skvrn na povrchu jogurtu. To naznačuje vyšší riziko lipolýzy uvolněného tuku a zhoršení chuťových vlastností a trvanlivosti produktu.

Statistický postup odvození limitu laktoferinu (LF) pro možnost identifikace použití ARPSB v bazénovém mléce byl popsán v předchozí metodice (HANUŠ et al., 2025, CM 48). Postup odvození thresholdu LF v mléce (individuální vzorky) pro subklinickou mastitidu při konfrontaci s hodnotami PSB ve třídách score PSB (indikační limit  $\geq 283$  tis./ml, score  $\geq 5$ ) ukázal hodnotu  $> 128,3$  mg/l a po relevantní metaanalýze finální hodnotu LF  $> 133,5$  mg/l (HANUŠ et al., 2026). Uvedené umožnilo navrhnout zmíněný limit LF pro bazénové mléko (identifikace ARPSB) jako průměr vlastních a literárních hodnot) pro tzv. „vysoký LF“ (indikační limit  $> 250$  mg/l), zakládající v bazénovém mléce (vzorku) podezření z přítomnosti neoprávněného (podezřelého) zastoupení mastitidního mléka v dodávce ke zpracování do mlékárny (tzn. z důvodu pro aplikaci ARPSB v praxi) pokud bude souběžně „nízký PSB“ (indikační limit  $\leq 350$  tis./ml). Zatímco tedy neobvyklá situace „vysokého záchyty LF“ a „nízkého PSB“ v individuálním mléce (KU) může znamenat predikční hodnotu LF pro budoucí mastitidu (hypotéza odvozena z výsledků práce CARLSSON et al., 1989), podobný nálezný v mléce bazénovém s vysokou pravděpodobností značí podezření na použití ARPSB (základ metodiky HANUŠ et al., 2025, CM 48). Vedle diskutovaného postupu identifikace ARPSB je znám doposud souběžně již jen postup podle GOLEBIEWSKI et al. (2025) a GWARDYS et al. (2025).

Referenční výsledky LF HPLC byly také použity k provedení kvalifikovaného odhadu distribuce LF v kravském mléce. Snížení počtu somatických buněk o 43,8 % (537 tis./ml;  $p < 0,001$ ; 100 % = původní mléko) centrifugací vedlo k odstranění 3,3 % LF (8,9 mg/l;  $p < 0,05$ ) přítomných na organelách neutrofilů. Snížení o 0,000 000 017 mg LF (8,9/537 000 000), jednu somatickou buňku, zbytek LF (celkem 96,7 %) zůstává volný v roztoku a na zbývajících somatických buňkách a není ovlivněn centrifugací. Pak 94,3 % LF je v roztoku volných, zbývajících cca. 5,7 % je za daných podmínek vázáno na organely neutrofilních leukocytů.

Hodnocení potenciálu MIR-FT pro identifikaci ARPSB nepřineslo očekávané výsledky, podrobnosti jsou uvedeny v příloze metodiky č. 2.

### **3) Vlastní metodika pro posouzení potenciálu analytických postupů k detekci ARPSB v syrovém mléce**

#### ***Krátké shrnutí metodických bodů***

V praxi lze předpokládat, že případné použití ARPSB přinese problémy pro sýrařskou technologii (výťažnost, čas syřitelnosti a pevnost sýřeniny mohou být negativně ovlivněny – praktická zkušenost).

Při aplikaci ARPSB nebude zhoršena kysací schopnost mléka ve fermentačních technologiích, ale v malovýrobních technologiích vsádkového (stacionárního) zpracování faremních jogurtů může být zaznamenán zvýšený výskyt malých tukových ok na povrchu produktu.

Při vzniku podezření na ARPSB analyzovat obsah laktoferinu (nejlépe metodou HPLC) v mléce a konfrontovat s ukazatelem PSB v třikrát opakovaných bazénových vzorcích mléka podle předchozí metodiky (HANUŠ et al., 2025, CM 48; LF > 250 mg/l, PSB ≤ 350 tis./ml).

Při vzniku podezření a provedení kontrolních analýz (v relevantně vybavených laboratořích s personálem znalým dané problematiky) mléka je třeba posoudit také faremní konkrétní výrobní podmínky s ohledem na definice poměrů vadného mléka (Tab. 4) a tuto analýzu zohlednit při formulaci závěru.

Provést analýzu dynamiky hodnot časových řad PSB v bazénovém mléce spolu s hodnotami laktózy a tukuprosté sušiny v podezřelé stáji s odborníkem znalým problematiky a tuto analýzu zohlednit při formulaci závěru.

Použít následně, při potvrzení podezření na použití ARPSB, pokud možno, více analytických metod průkazu v kombinaci s konfrontací LF a PSB (MALDI-TOF, NMR, analýzu mikroskopického obrazu mléka - GOLEBIEWSKI et al. (2025) a GWARDYS et al. (2025) pro zvýšení pravděpodobnosti správného závěru.

### **4) Závěr metodiky pro odhad rizika ARPSB**

Použití uvedených analytických postupů pro aproximační odhad rizika umělé redukce počtu somatických buněk (ARPSB) v syrovém kravském mléce je vyhrazeno pro bazénové mléko stád o alespoň 8 kravách (tedy s omezením vlivu časně laktace, ale zejména prodloužené). Metodika nabízí více pohledů a postupů, u některých po validaci, jak přistoupit k případné identifikaci rizika technologicky nežádoucí praxe ARPSB.

Účinnost identifikace ARPSB více jak 85 %, což může přibližně být potenciál, kterým disponují uvedené metody, však neznamená jistotu. Proto, při indikaci rizika ARPSB bude potřebné využít kombinace více uvedených postupů pro zvýšení pravděpodobnosti správné indikace.

Při interpretaci výsledků je třeba zvážit i podmínky možných technologických faktorů produkce mléka na farmě (přihlédnout k nim), shrnuté již dříve v Tab. 4 (HANUŠ et al., 2025; CM 48)

Vzhledem k rostoucímu významu mléka a mléčných výrobků v humánní výživě a snaze zpracovatelů mléka o zvyšování podílu produkce s vyšší přidanou hodnotou, je kontrola tohoto případného porušení autenticity suroviny ARPSB významná pro ekonomiku mlékařství.

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. Nejvyšší zahraniční odhady činí kolem 10 - 15 % (GOLEBIEWSKI et al., 2025) přičemž není uvedeno, zda c celého objemu, dílčích objemů mléka, nebo počtu stád. Při znalosti poměrů v ČR a relevantních zkušenostech z praxe by kvalifikovaný odhad mohl činit 2 – 3 %.

Metodika je inovativním rozšířením portfolia nabízených analytických, rutinních, laboratorních služeb mléčných laboratoří a identifikačních možností technologických nedostatků v mlékařství.

Postupy falšování (porušení autenticity) potravin a potravinových surovin obvykle, resp. často, něco do původního materiálu přidávají, méně často již něco odnímají. U mléka to může být zvodnění, ale i řada dalších nekorektních přísad (např. melamin) z různých důvodů, nebo naopak odběr tuku, kde další metody falšování s odběrem nějaké složky je již obtížnější nalézt. Ukazuje se také dlouhodobě, že potenciální analytické metody detekce lépe fungují v prvním případě, než ve druhém. I v tomto výzkumu se ukázala až neočekávaná problematičnost (složitost) průkazu ARPSB, kdy řada nadějných moderních analytických metod nepotvrdila svůj hypotetický potenciál pro identifikaci, když zejména při ARPSB jsou změny v původním materiálu, jak se ukazuje, až velmi nepatrné. To vše vyústilo v potřebu souběžné kombinace více analytických metod, s dílčím identifikačním potenciálem, ke zvýšení pravděpodobnosti správnosti identifikace.

Metodika při implementaci podporuje kvalifikaci personálu mléčných laboratoří. Přímým cílovým uživatelem výsledku může být relevantně analyticky vybavená (což je prakticky poměrně pravděpodobný budoucí scénář technologického vývoje) rutinní mléčná laboratoř v mlékařském systému (např. v kontrole mléčné užitkovosti dojnic, kontrole kvality mléka, kontrole technologického procesu v mlékárnách) pro rozšíření komerčního servisního analytického portfolia pro mlékařské odborníky.

# Srovnání „novosti postupů“ oproti původní metodice

- vyvinutá metodika byla předána pro užívání v systému kontroly kvality mléka a laboratorní práce (Moravia Lacto a.s., Jihlava) v elektronické;
- jedná se o souhrn nových validovaných postupů pro příležitostně vyžádanou kontrolu 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 identifikaci ARPSB 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;
- souhrn vývoje možností postupů a metodik specificky indikované kontroly autenticity (případného falšování) syrového kravského mléka podle kombinace výsledků různých mlékařských analytických metod 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 vznikly postupy, které jsou 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 (LRM) Brno, Českomoravská společnost chovatelů a. s. (ČMSCH a.s.), nebo pracovníci příjmových laboratoří mlékáren jako Moravia Lacto a.s., Jihlava);
- metodika možností postupů specifického stanovení podezření na porušení autenticity syrového kravského mléka pro podporu kvality a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce byla vydána elektronicky předána na příslušná pracoviště a informace o ní na MZe a do 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. Uvedené postupy nabízí analytické možnosti 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 až milionu. Efekt je opakovatelný po rocích.

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 obtížně vyčíslitelný, spočívající v možnosti kontroly porušování autenticity suroviny a podpoře bezpečnosti potravin ve veřejném zájmu.

# Seznam použité související literatury.

- ALI A. K. A., SHOOK G. E.: An optimum transformation for somatic cells concentration in milk. *Journal of Dairy Science*, 63, 1980, 487-490.
- ARIKAN M. S., MAT B., ALKAN H., ÇEVIRIMLI M. B., AKIN A. C., BAŞAR E. K., TEKINDAL M. A.: Determination of Subclinical Mastitis Prevalence in Dairy Cows in Türkiye through Meta-Analysis and Production Loss Calculation. *Pakistan Veterinary Journal*, 44, 2, 2024, 391-399. DOI: 10.29261/pakvetj/2024.142
- ATASEVER S., ERDEM H.: Estimation of milk yield and financial losses related to somatic cell count in Holstein cows raised in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8, 8, 2009, 1491-1494.
- BAUCH W., HUBER B., BUCHBERGER J.: Zum Einfluss einiger Parameter auf die Bestimmung des Gefrierpunktes von Milk mit den Cryostar II – LC. DMZ, *Deutsche Milchwirtschaftliche Zeitschrift, Lebensmittel und Milchwirtschaft*, 114, 5, 1993, 112-114.
- 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.
- BOBBO T., ZIDIB A., CASSANDRO M.: Combining total and differential somatic cell count to screen for mastitis. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 23, (Monothematic Issue: Future Perspectives in Animal Production), 2020, 88-96.
- BORKOVÁ M., SNÁŠELOVÁ J.: Possibilities of Different Animal Milk Detection in Milk and Dairy Products – a Review. *Czech Journal of Food Sciences*, 23, 2, 2005, 41-50.
- BROUWER T.: Calculations concerning the determination of the freezing-point depression of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 1981, 35.
- BUCHBERGER J., KLOSTERMEYER H.: Determination of freezing point in milk with the „System 4000 Milko-Scan” from Foss Electric A/S. DMZ, *Deutsche Milchwirtschaftliche Zeitschrift*, 23/24, 1995, 1-14.
- BUCHBERGER J.: Zum Gefrierpunkt der Milch: Bewertung und Interpretation. DMZ, *Deutsche Milchwirtschaftliche Zeitschrift*, 115, 8, 1994, 376-383.
- Bucek P., Kučera J., Chmelař 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.
- Carmo R. M. d., Nascimento L. E. C. D., Leao P. V. T., de Paula G. H., Dias M. B. d. C., Fernandes P. B., Mesquita A. A., Nicolau E. S., Rezende M. M. R., Sousa W. A. d., et al. (2024): Influence of Somatic Cell Removal on Milk Quality and Yield. *Beverages*, 10, 5, 1–10.
- CEHOVNÍ NORMA, Syrové kravské mléko, 2016-03-18-0127, dobrovolný akreditační systém Potravinářské komory České republiky (PKČR), 2016.
- CIRAK O., ICYER N. C., DURAK M. Z.: Rapid detection of adulteration of milks from different species using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). *Journal of Dairy Research*, 85, 2, 2018, 222-225. DOI: 10.1017/S0022029918000201

- 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.
- DI PINTO A., TERIO V., MARCHETTI P., BOTTARO M., MOTTOLA A., BOZZO G., BONERBA E., CECI E., TANTILLO G.: DNA-based approach for species identification of goat-milk products. *Food Chemistry*, 15, 229, 2017, 93-97. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.067
- FERNANDEZ A. M., OLIVEIRA C. A. F., LIMA C. G.: Effects of somatic cell counts in milk on physical and chemical characteristics of yoghurt. *International Dairy Journal*, 17, 2, 2007, 111-115. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.02.005
- GOLEBIEWSKI M. et al.: SGGW researchers use AI to assess milk quality. **Warsaw University of Life Sciences, 2025.** <https://www.sggw.edu.pl/en/ssggw-researchers-use-ai-to-assess-milk-quality/#:~:text=Milk%20fraud%2C%20which%20involves%20separating,of%20milk%20fraud%20from%20the>
- Gwardys G., Grodkowski G., Kostusiak P., Mendelowski W., Slószarz J., Satlawa M., Śmietanka B., Gwardys K., Golebiewski M., Puppel K.: Molecular remodeling of milk fat globules induced by centrifugation: Insights from deep learning-based detection of milk adulteration. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26, 119109. <https://www.mdpi.com/1422-0067/26/24/11919>
- HISIRA V., ZIGO F., KADAŠI M., KLEIN,R., FARKAŠOVÁ Z., VARGOVÁ M., MUDROŇ P.: Comparative analysis of methods for somatic cell counting in cow's milk and relationship between somatic cell count and occurrence of intramammary bacteria. *Veterinary Sciences*, 2024, 10, 5.
- KADEČKA J., ROZMAN J.: Chov skotu v proměnách času v Čechách se zaměřením na severovýchodní Čechy. ChovServis a.s., Hradec Králové, 2006, 124.
- KALOGIANNI D. P.: DNA-based analytical methods for milk authentication. *European Food Research and Technology*, 244, 5, 2018, 775-793.
- 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.
- 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
- KVAPILÍK J., HANUŠ O., BARTOŇ L., VYLETĚLOVÁ KLIMEŠOVÁ M., ROUBAL P.: Mastitis of dairy cows and financial losses: an economic meta-analysis and model calculation. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21, 5, 2015, 1092-1105. <https://www.agrojournal.org/21/05-28.pdf>
- KVAPILÍK J., HANUŠ O., SYRŮČEK J., VYLETĚLOVÁ KLIMEŠOVÁ M., ROUBAL P.: The economic importance of the losses of cow milk due to mastitis: a meta-analysis. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20, 6, 2014, 1501-1515. <https://www.agrojournal.org/20/06-31.pdf>
- 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
- MARTÍNEZ DE LA VARA J. A., HIGUERA A. G., ESTEBAN M. R., ASENSIO J. R., DELGADO M. C., BERRUGA I., MOLINA A.: Monitoring bulk milk quality by an integral traceability system of milk. *Journal of Applied Animal Research*, 46, 1, 2018, 784-790.
- MILLÁN-VERDÚ C., GARRIGÓS-OLTRA L., BLANES-NADAL G., DOMINGO-BELTRÁN M.: The History of Optical Analysis of Milk: The Development and Use of Lactoscopes. *Journal of Chemical Education*, 80, 7, 2003, 762-767.
- NICOLAOU N., XU Y., GOODACRE R.: Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species. *Journal of Dairy Science*, 93, 12, 2010, 5651-5660. DOI: 10.3168/jds.2010-3619
- PITKÄLÄ A., HAVERI M., PYÖRÄLÄ S., MYLLYS, V., HONKANEN-BUZALSKI T.: Bovine Mastitis in Finland 2001 - Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. *Journal of Dairy Science*, 87, 2004, 2433-2441.
- PSATHAS G., TZAMALOUKAS O.: Novel analytical technologies of Quality in the Sheep and Goat Dairy Sector. *Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 5, 2, 2017, 2348-9790, 1-10. <http://www.annepublishers.com/articles/JVSAH/5205-Novel-analytical-technologies-of-Quality-in-the-Sheep-&-Goat-Dairy-Sector.pdf>
- PYÖRÄLÄ S.: Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, 34, 2003, 556-578. DOI: 10.1051/vetres:2003026
- RAUBERTAS J. K., SHOOK G. E.: Relationship between lactation measures of SCC and milk yield. *Journal of Dairy Science*, 65, 1982, 419-425.
- REGULATION (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council.
- 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.

- SHIMADZU Excellence in Science: Analysis of Dicyandiamide and Melamine in Milk Powders by LC/MS/MS Method. LCMS-8040 UFMS, Application News, No. AD-0063, 2013.
- 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.
- STANEK P., ŹÓLKIEWSKI P., JANUŠ E.: A Review on Mastitis in Dairy Cows Research: Current Status and Future Perspectives. *Agriculture*, 2024, 14, 1292. DOI: 10.3390/agriculture14081292
- SUMON S. M. M. R., PARVIN M. S., EHSAN M. A., ISLAM M. T.: Dynamics of somatic cell count and intramammary infection in lactating dairy cows. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 7, 2, 2020, 314-319. DOI: 10.5455/javar.2020.g423
- SYRŮČEK J., LIPOVSKÝ D., SLÁDEK M. et al.: Chov skotu v České republice. Ročenka 2023. ČMSCH a.s. Praha, 2024, 43.
- TSAKALI E., AGKASTRA C., KOLIAKI C., LIVANIOS D., BOUTRIS G., CHRISTOPOULOU M. I., KOULOURIS S., KOUSSISSIS M., VAN IMPE J. F. M., HOUHOU D.: Milk Adulteration: Detection of Bovine Milk in Caprine Dairy Products by Real Time PCR. *Journal of Food Research*, 8, 4, 2019, 52-57.
- 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.
- ZACHAR P., ŠOLTÉS M., KASARDA R., NOVOTNÝ J., NOVIKMECOVÁ M., MARCINČÁKOVÁ D.: Analytical methods for the species identification of milk and milk products. *Mljekarstvo*, 61, 3, 2011, 199-207.
- ZECCONI A., ZANINI L., CIPOLLA M., STEFANON B.: Factors Affecting the Patterns of Total Amount and Proportions of Leukocytes in Bovine Milk. *Animals*, 10, 2020, 992. DOI:10.3390/ani10060992

# Seznam publikací, které předcházely metodice.

## Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech:

- DLUHOŠOVÁ S., BARTÁKOVÁ, K., VORLOVÁ, L., NAVRÁTILOVÁ, P., HANUŠ, O., SAMKOVÁ, E.: Dairy Chain Safety in the Context of Antibiotic Residues - Current Status of Confirmatory Liquid Chromatography Methods: A Review. Bezpečnost mléčného řetězce v kontextu reziduí antibiotik: Konfirmační metody kapalinové chromatografie - review. *Antibiotics*, 2024, 13, 1038.
- 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., 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., 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., NEJESCHLEBOVÁ H., BARTÁKOVÁ K., KLIMEŠOVÁ M., JEDELSKÁ R., KOPECKÝ J.: Laktoferin jako možný indikátor neoprávněného umělého snížení počtu somatických buněk syrového mléka. In Czech. Lactoferrin as a possible indicator of unauthorized artificial reduction of somatic cell count in raw milk. In proceedings: 28. Den VÚM, 2026.
- Hanuš O., Nejeschlebová H., Legarová V., Kejdová-Rysová L., Říha J., Samková E., Thompson G., Němečková I., Klimešová M., Kopecký J., Jedelská R.: The effect of artificial reduction of the somatic cell count, as a violation of authenticity, on milk quality indicators. Vliv umělého snížení počtu somatických buněk, jakožto narušení authenticity, na ukazatele kvality mléka. *Czech Journal of Animal Science*, 70, 8, 2025, 319-334.

- HANUŠ O., NEJESCHLEBOVÁ H., THOMPSON G., JEDELSKÁ R., TICHOVSKÝ P., KOPECKÝ J., SU M., ČEJKOVÁ J.: Možnosti detekce falšování mléka redukcí počtu somatických buněk různými metodami. Possibilities of detecting milk adulteration by reducing the somatic cell count using various methods. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 36, 213, 6, 2025, 1-5.
- 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, 1-7.
- HANUŠ O., ROUBAL P., KLIMEŠOVÁ M., JEDELSKÁ R., HEGEDŮŠOVÁ Z.: Retrospektivní analýza trendů vývoje dojivosti 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, 4-11.
- 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.
- KEJDOVÁ RYSOVÁ L., CEJNAR P., NEJESCHLEBOVÁ H., LEGAROVÁ V., MASCELLANI BERGO A., HAVLÍK J.: Klasifikace počtu somatických buněk metodou NMR spektroskopie jako nástroje pro detekci falšování kravského mléka. Poster, In „Den VÚM“. Praha: Národní zemědělské muzeum, 2025, Poster, 29. 5. 2025.
- KLIMESOVA M., KRIZOVA L., NEJESCHLEBOVA H., HANUS O., VORLOVA L.: Endogenous inhibitory compounds in bovine milk, their significance and methods of detection. Endogenní inhibiční složky v kravském mléce, jejich význam a metody detekce. *Czech Journal of Animal Science*, 70, 12, 2025, 499-517.
- NAVRÁTILOVÁ P., VORLOVÁ L., DLUHOŠOVÁ S., BARTÁKOVÁ K., HANUŠ O., SAMKOVÁ E.: Screening Methods for Antimicrobial Residues in the Dairy Chain - The Past and the Present. Screeningové metody na antimikrobiální rezidua v mléčném řetězci - minulost a současnost. *Antibiotics*, 2024, 13, 1098.
- NEJESCHLEBOVÁ H., HANUŠ O., BARTÁKOVÁ K., PARSONS C., SAMKOVÁ E., VORLOVÁ L., THOMPSON G., HASOŇOVÁ L., KONEČNÝ R., NAVRÁTILOVÁ P., KLIMEŠOVÁ M.: Lactoferrin content determined in bovine milk by HPLC and mid-infrared spectrometry - Relation to udder health and potential for detection of milk adulteration. Obsah laktoferinu stanovený v kravském mléce pomocí HPLC a střední infračervené spektrometrie - vztah ke zdraví vemene a potenciál pro detekci falšování mléka. *Czech Journal of Animal Science*, 70, 11, 2025, 467-479.

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.

NEJESCHLEBOVÁ H., HANUŠ O., KLIMEŠOVÁ M., SAMKOVÁ E., HASOŇOVÁ K., VORLOVÁ L., BARTÁKOVÁ K., NAVRÁTILOVÁ P.: Lysozym a jeho význam v mlékařství. Lysozyme and its role in dairy production. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 36, 212, 5, 2025, 6-10.

RYSOVÁ L., CEJNAR P., HANUS O., LEGAROVÁ V., HAVLIK J., NEJESCHLEBOVÁ H., NEMEČKOVÁ I., JEDELSKÁ R., BOŽIK 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

RYSOVÁ L., LEGAROVÁ V., PACÁKOVÁ Z., HANUS O., NEMEČKOVÁ I., KLIMEŠOVÁ M., HAVLIK, J.: Detection of bovine milk adulteration in caprine milk with *N*-acetyl carbohydrate biomarkers by using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Detekce falšování bovinního mléka v kozím mléce biomarkery *N*-acetyl karbohydrátu pomocí <sup>1</sup>H nukleární magnetické rezonanční spektroskopie. *Journal of Dairy Science*, 104, 9, 2021, 9583-9595. DOI: 10.3168/jds.2020-20077

### **Předchozí tematicky relevantní metodiky k problematice 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. (CM46) ISBN: 978-80-88390-12-1. Uplatněno u Svazu výrobců mléka a.s. Doložena smlouvou ze dne 21.11.2024. Uznána dne 05.12.2024. Osvědčení číslo: SVS/2024/176939-G.

[https://agronavigator.cz/sites/default/files/users/user446/Postup\\_rychleho\\_stanoveni\\_laktoferinu.pdf](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. ISBN 978-80-213-3154-9. Uplatněno u Státní veterinární správy ČR. Datum podpisu smlouvy 22.04.2022. Uznána dne 17.05.2022. Osvědčení číslo: SVS/2022/067167-G.

<https://metodiky.agrobiologie.cz/detekce-falsovani-koziho-a-ovciho-mleka-kravskym-mlekem-metodou-maldi-tof-ms/>

[https://agronavigator.cz/sites/default/files/users/user291/Metodiky/Potravin%C3%A1%C5%99stv%C3%AD/Metodika\\_MALDI\\_fin%C3%A1n%C3%AD\\_verze.pdf](https://agronavigator.cz/sites/default/files/users/user291/Metodiky/Potravin%C3%A1%C5%99stv%C3%AD/Metodika_MALDI_fin%C3%A1n%C3%AD_verze.pdf)

RYSOVÁ L., PACÁKOVÁ Z., HANUŠ O., HAVLÍK J., MASCELLANI A., LEGAROVÁ V., NEJESCHLEBOVÁ H., NĚMEČKOVÁ I.: Detekce falšování kozího mléka kravským mlékem metodou <sup>1</sup>H NMR. ISBN 978-80-213-3143-3. Uplatněno u Státní veterinární správy ČR. Datum podpisu smlouvy 06.12.2021. Uznána dne 06.01.2022 Státní veterinární správou. Osvědčení číslo: SVS/2022/003255-G.

<https://metodiky.agrobiologie.cz/detekce-falsovani-koziho-mleka-kravskym-mlekem-metodou-1h-nmr/>

[https://agronavigator.cz/sites/default/files/users/user291/Metodiky/Potravin%C3%A1%C5%99stv%C3%AD/Metodika\\_Fal%C5%A1ov%C3%A1n%C3%AD\\_NMR\\_final.pdf](https://agronavigator.cz/sites/default/files/users/user291/Metodiky/Potravin%C3%A1%C5%99stv%C3%AD/Metodika_Fal%C5%A1ov%C3%A1n%C3%AD_NMR_final.pdf)

HANUŠ O., BARTÁKOVÁ K., NEJESCHLEBOVÁ H., VORLOVÁ L., NAVRÁTILOVÁ P., KLIMEŠOVÁ M., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R., NEJESCHLEBOVÁ L.: Postup rychlého aproximačního odhadu obsahu lysozymu v mléce rutinní metodou infračervené spektrometrie. (CM47) ISBN: 978-80-88390-11-4. Uplatněno u Moravia Lacto a.s., 31.10.2025. Uznána dne 02.12.2025. Osvědčení číslo: 7796/2025-ČPI

[https://agronavigator.cz/sites/default/files/2025-12/Postup\\_rychleho\\_aproximacniho\\_odhadu\\_obsahu\\_lysozymu\\_v\\_mlece\\_MIRFT.pdf](https://agronavigator.cz/sites/default/files/2025-12/Postup_rychleho_aproximacniho_odhadu_obsahu_lysozymu_v_mlece_MIRFT.pdf)

HANUŠ O., NEJESCHLEBOVÁ H., KLIMEŠOVÁ M., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R., NEJESCHLEBOVÁ L.:  
Vybrané mastitidní ukazatele jako příznaky podezření na neoprávněné snížení počtu  
somatických buněk v syrovém kravském mléce. (CM48) ISBN: 978-80-88390-14-5. Uplatněno  
u Moravia Lacto a.s., 08.10.2025. Uznána dne 27.11.2025. Osvědčení číslo: SVS/2025/176103  
<https://agronavigator.cz/sites/default/files/2026-01/Vybrane-mastitidni-ukazatele-neopravnene-snizeni-PSB-mleka.pdf>

Ne všechny práce ze seznamu literatury 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:**

**Mgr. Hana Nejeschlebová**



# Příloha č. 1

## Detekce falšovaných vzorků mléka na základě měření aktivity vybraných nativních enzymů

Aktivita některých enzymů mléka je úzce spjata se zdravotním stavem mléčné žlázy. U aktivity některých enzymů (např. kataláza, laktátdehydrogenáza (LDH), esteráza) byly zjištěny korelace s počtem somatických buněk (PSB).

### ***Hypotéza:***

Odstředěním mléka dojde ke snížení PSB, aktivita enzymů nebude tímto ošetřením významně ovlivněna. U falšovaných vzorků tak lze předpokládat PSB nižší než  $400 \cdot 10^3/\text{ml}$  a současně vysokou aktivitu enzymů.

### ***Metodika:***

Bylo odstředěno 64 vzorků mléka. U původních i odstředěných vzorků mléka byl současně stanoven PSB ( $10^3/\text{ml}$ ) průtokovou cytometrií přístrojem Somacount 300 (Bentley Instruments Inc., Chaska, Minnesota, USA) a aktivita enzymů katalázy, LDH a esterázy.

### ***Stanovení aktivity katalázy v mléce***

#### *Princip:*

Enzym kataláza rozkládá peroxid vodíku na kyslík a vodu. Disk namočený v mléce po vhození do zkumavky obsahující peroxid vodíku klesne ke dnu, avšak v důsledku kyslíku vznikajícího rozkladem peroxidu vodíku je opětovně vynesena na hladinu. Čas, za který tento jev nastane, je nepřímo úměrný aktivitě katalázy v mléce.

#### *Postup:*

Na disky o průměru 6 mm bylo nanášeno 15  $\mu\text{l}$  syrového mléka.

Následně byly disky vhozeny do zkumavky s obsahem 5 ml 3% peroxidu vodíku v Tris HCl (Sigma Aldrich), pH 7,2.

Byl zaznamenán čas (s), který uplynul mezi okamžikem vhození disku do zkumavky a jeho vyplaváním na hladinu.

### ***Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy v mléce: Uddercheck (Portachek)***

#### *Princip:*

Reagenční podložka testovacího proužku obsahuje imobilizovaný substrát L-laktát. V sérii sprážených reakcí je L-laktát oxidován enzymem LDH a současně je redukován indikátor nitrotetrazoliová modř na fialový formazan. Intenzita fialové barvy je uměrná aktivitě LDH v mléce.

### *Postup:*

Testovací proužek je ponořen do vzorku mléka, následně vyjmut a po 2 minutách je odečten výsledek dle barevné škály. Test umožňuje stanovit aktivitu LDH na 4 hladinách <100 U/l, 100–200 U/l, 200–500 U/l, >500 U/l.

### ***Stanovení aktivity esterázy v mléce: PortaSCC Quick Test (Portacheck)***

#### *Princip:*

V důsledku chemické reakce barviva na testovacím proužku s enzymem esterázou v mléce dochází k modrému zbarvení proužku, jehož intenzita je úměrná aktivitě esterázy. Výsledek testu je vyjádřen jako hodnota PSB.

#### *Postup:*

Vzorek je po promíchání nanesen na testovací proužek (4 kapky), je přidán aktivační roztok (4 kapky) a po 5 minutách je výsledek odečten dle barevné škály. Test umožňuje stanovit PSB na 4 hladinách  $\leq 100 \cdot 10^3/\text{ml}$ ,  $250 \cdot 10^3/\text{ml}$ ,  $500 \cdot 10^3/\text{ml}$ ,  $750 \cdot 10^3/\text{ml}$ ,  $1500 \cdot 10^3/\text{ml}$ ,  $\geq 3000 \cdot 10^3/\text{ml}$ .

### ***Statistické hodnocení***

Pro PSB a aktivitu katalázy, vyjádřenou nepřímo jako doba vyplavání disku, byla u původního i odstředěného mléka vypočtena základní popisná statistika. Dále byl mezi hodnotami původního a odstředěného mléka stanoven průměrný rozdíl, směrodatná odchylka tohoto rozdílu, relativní hodnota průměrného rozdílu (%) a byl vypočten Pearsonův korelační koeficient a párový *t*-test. Mezi hodnotami PSB a dobou vyplavání disku byl pro původní i odstředěné mléko vypočten Pearsonův korelační koeficient. PSB i doba vyplavání disku byly pro výpočty korelací použity po logaritmické transformaci. Výsledky aktivity LDH a esterázy stanovené semikvantitativními testy byly vyjádřeny jako četnosti jednotlivých kategorií u testovaných vzorků.

### ***Výsledky a diskuze***

PSB, stanovený průtokovým cytometrem poklesl po odstředění mléka průměrně o 49,1 % ( $p < 0,001$ ; tabulka 1). Katalázový test současně ukázal mírné prodloužení doby vyplavání disku o 8,4 % u odstředěných vzorků (tabulka 2), což odpovídá poklesu aktivity katalázy o 8,4 % (doba vyplavání je nepřímo úměrná aktivitě katalázy). Tato změna byla však párovým *t*-testem vyhodnocena jako nevýznamná ( $p > 0,05$ ). Mezi PSB a dobou vyplavání disku byl prokázán nepřímo úměrný vztah, vyjádřený zápornými hodnotami korelačního koeficientu jak u původního mléka ( $r = -0,68$ ), tak u mléka odstředěného ( $r = -0,69$ ), což potvrzuje souvislost mezi PSB a aktivitou katalázy.

Aktivita LDH stanovená semikvantitativním komerčním testem Uddercheck vlivem odstředění nevykázala žádnou změnu, na žádné z hladin aktivity (tabulka 3). Oproti tomu PSB stanovený semikvantitativním testem Porta SCC Quick Test založeným na aktivitě esterázy poklesl přibližně o 50 % (tabulka 4), tedy obdobně jako PSB stanovený průtokovým cytometrem, který detekuje přímo DNA somatických buněk po obarvení jádra. Barevná škála esterázového testu umožňovala kvantifikovat aktivitu esterázy pouze do nejnižší kategorie odpovídající PSB  $\leq 100 \cdot 10^3/\text{ml}$ . U odstředěných vzorků byla sice vizuálně patrná ještě nižší intenzita zbarvení (odhadem 50% pokles), avšak tuto skutečnost již nebylo možné vyjádřit číselně v rámci použité stupnice.

Uvedené výsledky naznačují možnost využití stanovení aktivity katalázy a LDH pro detekci falšování mléka prostřednictvím umělého snížení PSB. Jedná se tak o ukazatele vhodné k dalšímu testování některou z přesnějších kvantitativních metod, neboť použité testy byly orientačními metodami zvolenými pro prvotní screening vlivu odstředění na aktivitu enzymů.

Tabulka 1 Počet somatických buněk (PSB) v původním a odstředěném mléce, n = 64

	PSB (10 <sup>3</sup> /ml)	
	Původní mléko (P)	Odstředěné mléko (O)
Průměr	613	318
Průměr geometrický	312	112
Směrodatná odchylka	994	630
Minimum	38	4
Maximum	5022	3500
Rozdíl průměrů O–P		–295
Směrodatná odchylka rozdílu O–P		393
Relativní rozdíl O–P (%) <sup>*</sup>		–48,2
Pearsonův korelační koeficient		0,93
<i>p</i>		<0,001

<sup>\*</sup> relativní rozdíl O–P (%) = rozdíl O–P/ průměr P × 100

Tabulka 2 Doba vyplavání disku (nepřímý ukazatel aktivity katalázy) v původním a odstředěném mléce, n = 64

	Čas vyplavání disku na hladinu (s)	
	Původní mléko (P)	Odstředěné mléko (O)
Průměr	607	658
Průměr geometrický	427	415
Směrodatná odchylka	631	765
Minimum	85	78
Maximum	3600	3600
Rozdíl O–P		51
Směrodatná odchylka rozdílu O–P		259
Relativní rozdíl O–P (%) <sup>*</sup>		8,4
Pearsonův korelační koeficient		0,97
<i>p</i>		>0,05

<sup>\*</sup> relativní rozdíl O–P (%) = rozdíl O–P/ průměr P × 100

Pozn. Aktivita katalázy byla hodnocena nepřímo na základě doby vyplavání disku; kratší doba vyplavání odpovídá vyšší enzymatické aktivitě.

Tabulka 3 Aktivita LDH u původního a odstředěného mléka

Aktivita LDH	Původní mléko (n)	Odstředěné mléko (n)
<100 U/L	41	41
100–200 U/L	15	15
200–500 U/L	6	6
>500 U/L	2	2

Tabulka 4 Rozdělení hodnot počtu somatických buněk (PSB) stanovených esterázovým testem (Porta SCC Quick Test) v původním a odstředěném mléce

PSB ( $10^3/\text{ml}$ )	Původní mléko (n)	Odstředěné mléko (n)
$\leq 100^*$	32	51
250	16	10
500	9	2
750	5	1
1500	2	0
$\geq 3000$	0	0

\* Po odstředění byl u vzorků s původní hodnotou PSB v kategorii  $\leq 100 \cdot 10^3/\text{ml}$  vizuálně patrný pokles intenzity zbarvení ( $\approx 50\%$ ), avšak tuto změnu již nebylo možné číselně rozlišit v rámci použité stupnice.

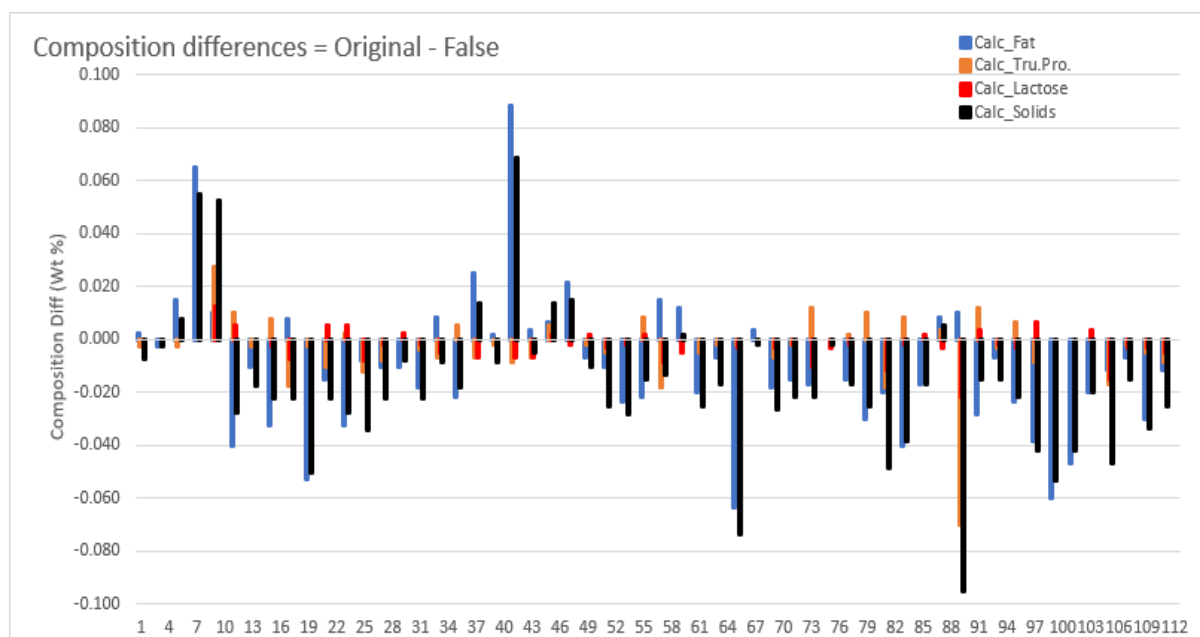
# Příloha č. 2 metodiky:

## Přístup k vyhodnocování vlivů ARPSB na IR spektra mléka metodou MIR-FT

Byla porovnána sada vzorků původního mléka, podle metodického postupu metodiky, s identickými vzorky po ARPSB. Nejzřetelnější účinky by měly být patrné při porovnávání každého vzorku se sebou samým, před a po ARPSB. I když to v praxi nevede k užitečnému způsobu identifikace centrifugovaných vzorků, pokud nejsou vidět zjevné rozdíly před a po, je identifikace těchto vzorků na základě jediného spektra „po“ obtížnější.

Byly vypočteny průměrné hodnoty spektra a složení pro každý vzorek ze všech opakovaných měření vzorků. Poté byl vypočten rozdíl (originál – falsifikát) pro složení a každý spektrální bod. Bylo také vypočteno celkové průměrné diferenční spektrum pro všechny vzorky, originál – falsifikát.

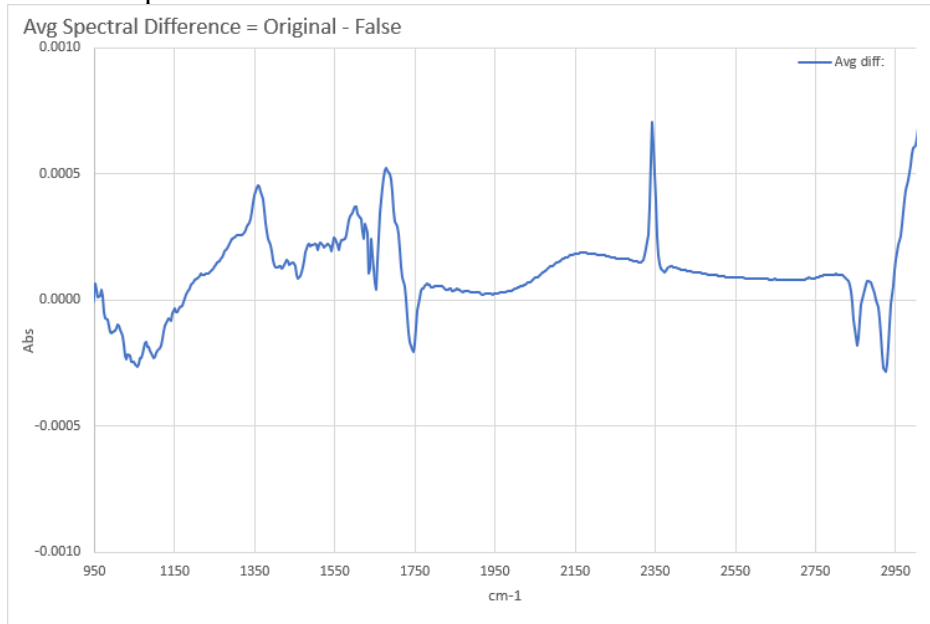
Rozdíly ve složení hlavních složek podle vzorku.



Craig Parsons, Bentley Instruments, 2025.

Největší rozdíly jsou u tuku a pevných látek, které vypadají podobně. Celkově mají falešné vzorky, které byly centrifugovány, vyšší složení tuku než původní vzorky. Rozdíly jsou minimální, protože vzorky po byly záměrně adjustovány na tuk podle výsledku před. Bílkoviny a laktóza vykazují menší rozdíly.

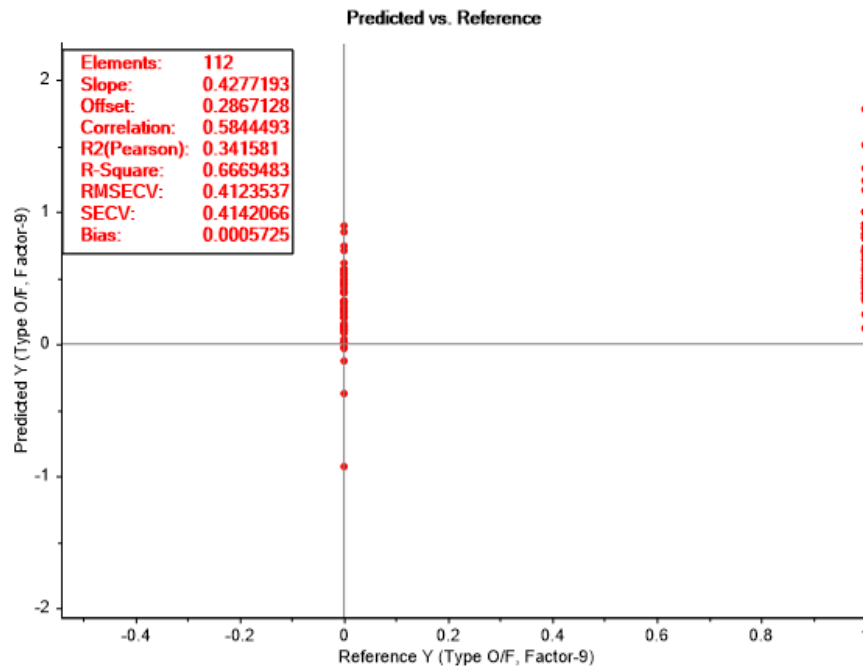
## Průměrné rozdílové spektrum.



Craig Parsons, Bentley Instruments, 2025.

Nejzajímavějšími rysy jsou široký pokles při 1060 cm<sup>-1</sup> a vrchol při 1365 cm<sup>-1</sup>. Tyto rysy jsou pozorovány i u menší podmnožiny vzorků, které mají po centrifugaci nižší obsah tuku. To může být nadějně, že tyto spektrální oblasti by mohly být indikátory historie centrifugace vzorku.

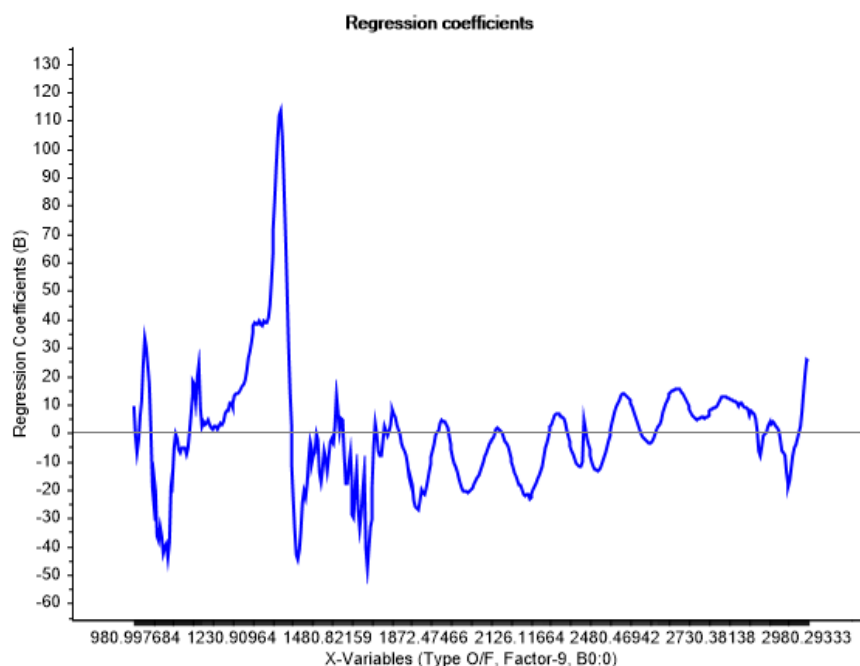
Provedení parciální regrese nejmenších čtverců na spektrálních datech s referenčními hodnotami 0 pro původní vzorky a 1 pro nepravdivé vzorky nevede k užitečné separaci.



Craig Parsons, Bentley Instruments, 2025.

Koeficienty zdůrazňují spektrální oblast, kterou dřívější analýza identifikovala jako důležitou, což naznačuje, že se algoritmus snaží, ale evidentně je ve spektrech příliš mnoho konkurenčních variací v závislosti na složení vzorku, aby se vytvořilo jasné rozlišení mezi těmito dvěma typy vzorků.

Práce Gwardys et al. (2025) mnohé naznačila. Pokud je pravda, že centrifugace narušuje samotné tukové globule, možná spektrální rys 1365  $\text{cm}^{-1}$  souvisí s těmito globulemi.



Craig Parsons, Bentley Instruments, 2025.

Práce Gwardys et al. (2025) je zajímavá. Zdá se, že navrhovaný vliv ARPSB na mléko je kvalitativně konzistentní se spektrálními výsledky z našich dat. Gwardys et al. (2025) tvrdí, že centrifugace neovlivňuje samotnou tukovou globuli, ale její molekulární složku. U vašich vzorků porovnání vzorků před a po centrifugaci spektrálně odhalilo několik spektrálních vrcholů. Vzhledem k tomu, že vzorky před i po centrifugaci jsou homogenizovány, což jistě modifikuje tukové globule, je to v souladu s jejich navrhovaným mechanismem změny samotných molekulárních nebo micelárních složek. Možná, že vrcholy, které pozorujeme, jsou znaky těchto modifikovaných druhů.

Nicméně, rozumný postup pro identifikaci ARPSB prostřednictvím spekter MIR-FT nebyl nalezen jako dostatečně uspokojivý, zřejmě pro množství výskytu různých interferenčních efektů.

Datum: 03.04.2026

**Za zhotovitele:**

**Mgr. Hana Nejeschlebová**

