



## **CM41\_2022**

# **Alternativy ošetření a transportu vzorků v kontrole mléčné užitkovosti pro věrohodné výsledky analýz**

**(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)**

### **Zpracovali:**

Oto Hanuš, Hana Nejeschlebová, Marcela Klimešová, Radoslava Jedelská,  
Zdeňka Hegedušová, Radek Holásek, Jaroslav Kopecký

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

ISBN 978-80-88390-04-6 (MILCOM)

**Leden 2022**

**Vydavatel:**

Pro: Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. vydal MILCOM a.s.,  
Ke Dvoru 12a, Praha 6, 16000

**Forma vydání:**

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF.

**Zveřejněno na webové stránce:**

[https://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/cm41\\_2022.pdf](https://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/cm41_2022.pdf)

1. Vydání 2022

ISBN 978-80-88390-04-6 (MILCOM)

**Podíl autorů na tvorbě certifikované metodiky:**

Oto Hanuš (40 %), Hana Nejeschlebová (20 %), Marcela Klimešová (10 %),  
Radoslava Jedelská (10 %), Zdeňka Hegedüšová (10 %), Radek Holásek (5 %),  
Jaroslav Kopecký (5 %)

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

- 1) Odborník z daného oboru: Ing. Libor Janů Ph.D., pracoviště: Everstar s.r.o. Šumperk, chemik, odborník na čisticí a dezinfekční roztoky a analýzy mléka, vedoucí laboratoře a technologie výroby;
- 2) Pracovník státní správy: Ing. Zdenka Majzlíková, pracoviště: Česká plemenářská inspekce, Praha – odborník v kontrole užitekosti zvířat a v mlékařství.

**Dedikace na projekt:**

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu MZe NAZV ZEMĚ QK 21010123 s názvem: Vývoj metod redukce průniku antibiotik do prostředí v chovu dojnic jako podpora prevence vzniku antibiotické rezistence mikroorganismů a podpory na rozvoj výzkumné organizace č MZe RO 1421.

Projekty a podpory rozvoje instituce (podíly): MZe RO 1421 (50 %) a MZe NAZV ZEMĚ QK 21010123 (50 %).

**Certifikovaná uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) k řešení rutinních systémů analytické laboratoře v kontrole mléčné užitkovosti k testaci složek a vlastností individuálních vzorků mléka a pro zvýšení věrohodnosti analytických výsledků prostřednictvím kontroly podmínek transportu vzorků.**

#### **I) Cíl certifikované uplatněné metodiky:**

Cílem certifikované metodiky RO1421 CM 41 je podpora kontrolních metod a zajištění a zvýšení věrohodnosti výsledků a provozní jistoty managementu rutinních analytických laboratoří v systému kontroly mléčné užitkovosti (individuální vzorky mléka - podpora šlechtění zvířat) prostřednictvím kontroly podmínek transportu vzorků a také podpora postupů pro zajištění kladného průběhu relevantních akreditačních auditů (ČIA) a oficiálních mezinárodních auditů, např. ICAR.

#### **Náplň certifikované uplatněné metodiky:**

Náplní certifikované metodiky RO 1421 CM 41 je implementace dosažených výsledků, získaných na základě předchozího a současného výzkumu a vývoje v rámci řešení projektů MZe NAZV ZEMĚ QK 21010123 a MZe RO 1421, do prostředí systému práce rutinní analytické laboratoře kontroly mléčné užitkovosti pro podporu spolehlivosti dat ke šlechtitelské práci v chovu dojeného skotu a ke kontrole zdraví mléčné žlázy dojnic.

**Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů metodiky od 01.02.2022.**

## **II) Vlastní popis certifikované metodiky**

### **Alternativy ošetření a transportu vzorků v kontrole mléčné užitkovosti pro věrohodné výsledky analýz**

#### **Struktura certifikované metodiky:**

#### **Nejčastěji použité zkratky**

##### **1) Úvod – literární podklady a současná situace**

*Kontrola mléčné užitkovosti (KU);*

*Kontrola mléčné užitkovosti aktuálně v ČR;*

*Význam analýz vlastností a kvality syrového mléka;*

*Význam věrohodnosti výsledků analýz syrového mléka v mlékařství;*

*Mlékařský analytický systém a základní mléčné ukazatele;*

*Význam ošetření vzorků mléka po odběru do analýzy.*

##### **2) Cíl metodiky ošetření a transportu vzorků mléka v KU**

##### **3) Vlastní metodika ošetření a transportu vzorků mléka v KU**

*A - Výsledky analýzy kontrolních systémů transportu vzorků v KU;*

*B - Možnosti ošetření vzorků mléka v KU od odběru po transport k analýze;*

*C - Konstatování a doporučení k ošetření vzorků mléka v KU od odběru po transport k analýze.*

##### **4) Závěr certifikované metodiky ošetření a transportu vzorků mléka v KU**

##### **5) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky**

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

*Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech;*

*Předchozí tematicky relevantní certifikované metodiky k problematice provedení ošetření vzorků mléka v kontrole mléčné užitkovosti.*

##### **7) Přílohové materiály s podklady pro retrospektivní analýzu v rámci certifikované metodiky**

### Nejčastěji použité zkratky:

B = obsah bílkovin;

CF nebo C = České strakaté;

CPM = celkový počet mezofilních mikroorganismů;

CPP = celkový počet psychrotrofních mikroorganismů;

ČR = Česká republika;

ČIA = Český institut pro akreditaci o.p.s, Praha;

ČMSCH a. s. = Českomoravská společnost chovatelů;

H = Holštýn;

HB = obsah hrubých bílkovin;

ICAR = Mezinárodní výbor pro kontrolu užítkovosti zvířat;

KU = kontrola mléčné užítkovosti;

KTJ = CFU = kolonii tvořící jednotka;

L = obsah laktózy;

LRM = laboratoř rozborů mléka;

MIR-FT = technologie infraanalýzy mléka s celým spektrem pomocí Michelsonova interferometru a s využitím Fourierových transformací;

pH = aktivní kyselost;

PSB = počet somatických buněk;

PT = proficiency testing, výkonnostní testování analytické způsobilosti;

SH = titrační kyselost mléka;

T = obsah tuku;

TPS = obsah sušiny tukuprosté;

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

## 1) Úvod – literární podklady a současná situace

### *Kontrola mléčné užitkovosti (KU)*

Člověk dlouhodobě provádí umělý výběr a cílené šlechtění plemen různých druhů hospodářských, resp. domácích zvířat. Tento postup byl i součástí domestikace v rámci procesu tzv. neolitické revoluce. V širším historickém kontextu poskytl základy vývoje lidských civilizací a vzniku kultury. Lze obecně diskutovat o periodě trvající 10 000 roků.

Aby do tohoto, zpočátku roztržitěného, úsilí, byl vnesen systém, byla v roce 1895 zahájena v Dánsku kontrola užitkovosti (KU). Ta odstartovala u krav, jako kontrola mléčné užitkovosti (dojivosti). KU byla postupně rozšiřována na další kategorie skotu a ostatní druhy hospodářských zvířat. V Čechách a na Moravě následoval tento proces v rocích 1905 a 1906. Toto významné chovatelské opatření probíhá tedy v ČR již déle, než 100 let (HERING et al., 2005; KADEČKA a ROZMAN, 2006).

Cílem KU je zjišťovat užitkové vlastnosti hospodářských zvířat pro jejich selekci, vzájemné cílené připařování a tím zušlechťování, čili zlepšování užitkových vlastností. Uvedená činnost nutně souvisí se záznamy, evidencí, tvorbou databází a statistickým vyhodnocováním. KU je dnes základem kontroly dědičnosti. Spektrum sledovaných ukazatelů užitkovosti se od počátečních záznamů dojivosti neustále rozšiřovalo (rámcový vývoj, individuální vzorky mléka, Tab. 1). Historický vývoj lze rámcově znázornit i pro ukazatele kvality mléka (bazénové vzorky, Tab. 2).

Tab. 1 Záznam vývoje sledování základních mléčných ukazatelů v KU.

Historicky, následující rutinní vyšetření byla zohledněna během procesu šlechtění skotu:

- exteriér (cca 7 tis. roků);
  - užitkové vlastnosti:
    - mléčná užitkovost (cca 5 tis. roků);
    - množství a obsah tuku (cca 100 roků);
    - množství a obsah bílkovin (cca 40 roků);
    - genetické markery (např. kapa kasein, cca 30 roků);
    - počet somatických buněk v mléce (cca 25 roků).
- analytická fáze  
kontroly mléčné  
užitkovosti po cca 100  
roků

Tab. 2 Celková obvyklá dnešní sada rutinně zkoušených parametrů syrového mléka v laboratorních kontroly užítkovosti (KU).

Ukazatel individuálního vzorku mléka	Specifikace		
	Charakter	Použití	Poměr v KU
Tuk	S, Z, K	O, E	100 %
Laktóza	Z	O, E	100 %
Bílkoviny	S, K	O, E	100 %
Kasein	K, T	P, E	do 20 %
Kapa kasein	S	P	do 25 %
Počet somatických buněk	Z, S	O, E	od 80 do 100 %
Močovina	K, Z, R	O, E	do 80 %
Aceton	K, Z, R	P, E	do 80 %
Progesteron	R	P, E	do 10 %
Bod mrznutí	K, T	P, E	do 5 %
Inhibiční látky	T	P, E	do 10 %

S = šlechtění; Z = monitoring zdravotního stavu; R = monitoring reprodukce; K = monitoring krmení; T = technologický monitoring; O = obvyklé; P = příležitostné; E = poradenství;

Jak uvedl prof. Taufer (1869 – 1940; cit. HERING et al., 2005) na adresu KU v jejím raném období: „Bez kontroly užítkovosti není zušlechťovacích akcí, bez kontroly dědičnosti hyne každé kulturní plemeno. Kontrola hospodárnosti zárodečné hmoty a koloběhu živin není proto jen přechodnou akcí zvelebovací, nýbrž zušlechťovací prací trvalou, což si musí uvědomit nejen ti, kteří kontrolu užítkovosti a dědičnosti řídí, nýbrž také ti, v jejichž stádech se kontrola provádí.”

Kontrola mléčné užítkovosti (KU) v chovech krav je jedním ze základních populačně biotechnologických opatření, které slouží chovatelům a šlechtitelům pro selekci zvířat (HERING et al., 2005), práci se stádem, a je zároveň zdrojem informací upozorňujících na nedostatky managementu v oblastech výživy, zoohygieny a prevence. Prostřednictvím internacionální organizace ICAR (International Committee for Animal Recording, 2008) autorizovaná KU je důležitá pro uznání mezinárodního obchodu s plemenným materiálem. Proto použité dílčí metodicko-technologické postupy v KU musí být validovány pro možnost autorizace celku.

Obsáhlou dotazníkovou instruktivní pasportizaci metod KU, souvisejících se zaváděním automatických dojitých systémů provedli, v rámci působnosti ICAR, pro účely ČMSCH, BUCEK et al. (2015). Informace zahrnují zastoupení světových organizací a metod KU v ICAR. Tyto podklady podtrhují světový význam ICAR a KU.

Výsledky složení a vlastností mléka jsou pro KU a následné šlechtění velmi výhodné. V případě analýz individuálních vzorků mléka se předně jedná o neinvazivní vzorkování, na rozdíl např. od vzorků moče nebo krve. Lze vzorkovat pravidelně, bazénové vzorky mléka pro kontrolu kvality a individuální pro šlechtění a kontrolu zdraví dojníc. Analýzy jsou často automatizované s vysokou efektivitou. Výsledky lze hromadně využívat s pomocí aplikačních software.

Rámcové shrnutí možné sady mléčných ukazatelů zjišťovaných pravidelně nebo příležitostně u krav v KU, pro individuální vzorky mléka, je obsaženo v Tab. 3.

Tab. 3 Rámcové shrnutí vývoje vyšetřování mléka až do KU.

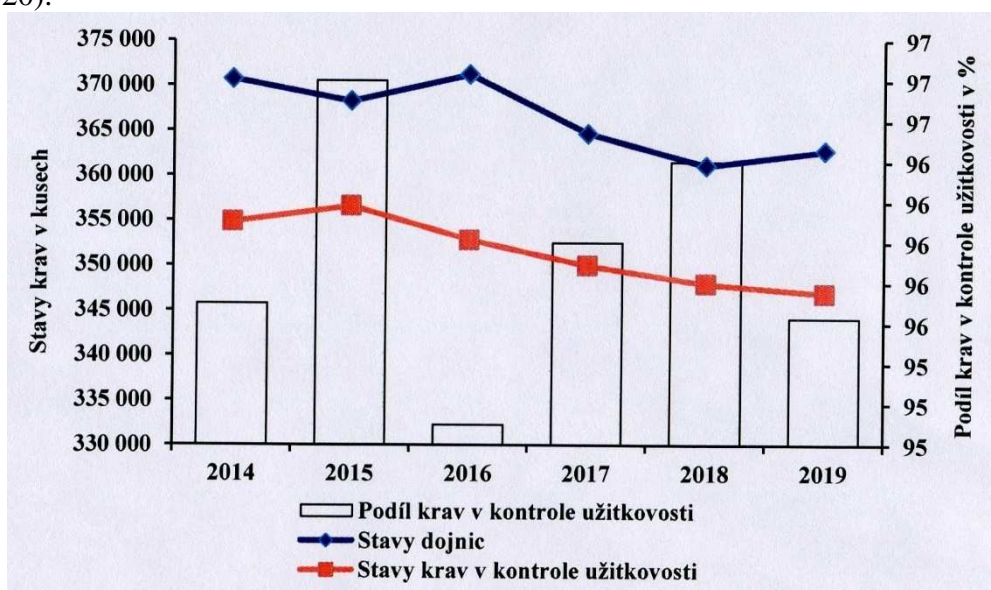
Historie vyšetřování kvality syrového mléka ve smyslu rutinních analýz potravinářské suroviny:

- barva, chuť a vůně (7 tis. roků);
- některé technologické vlastnosti (kyselost atd., cca 100 roků);
- chemické složky (cca 80 roků);
- fyzikální vlastnosti (cca 80 roků);
- mikrobiologická kontaminace (cca 50 roků).

### ***Kontrola mléčné užitkovosti aktuálně v ČR***

V ČR je v KU zapojeno 95,6 % dojnic (2019, BUCEK et al., 2020). Historicky to bývalo převážně více, 100 % za státem řízené ekonomiky. Po společenských změnách (1989) došlo k poklesu, v roce 2000 a 2005 uváděli KVAPILÍK et al. (2006) 93,0 a 95,9 %. Lze uvést, že od roku 2005 se procento zapojení krav stabilizovalo, i když absolutní počet průběžně stále klesal. Stav v aktuálním období je v grafu na Obr. 1.

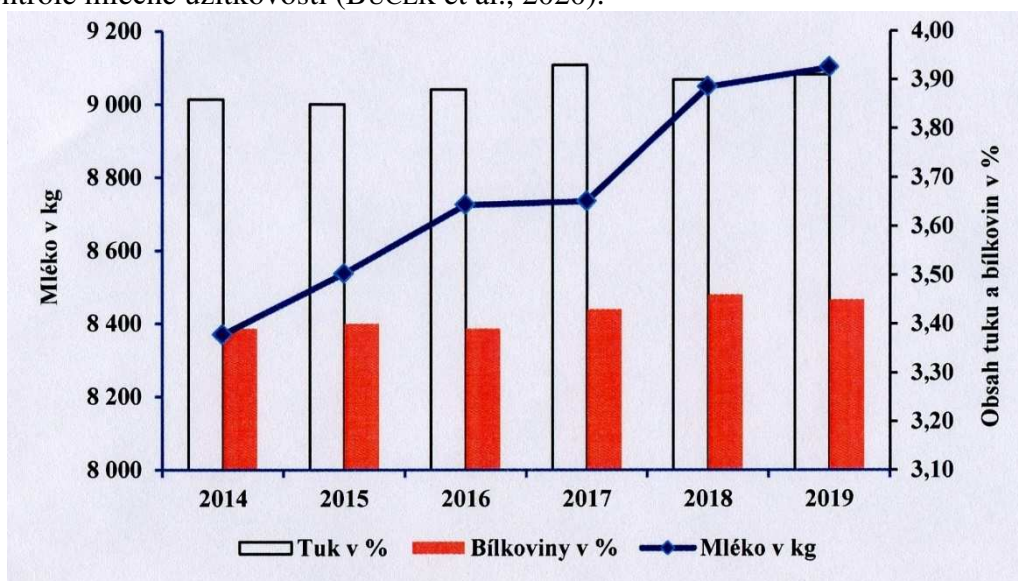
Obr. 1 Aktuální rozsah kontroly mléčné užitkovosti v České republice (podle BUCEK et al., 2020).



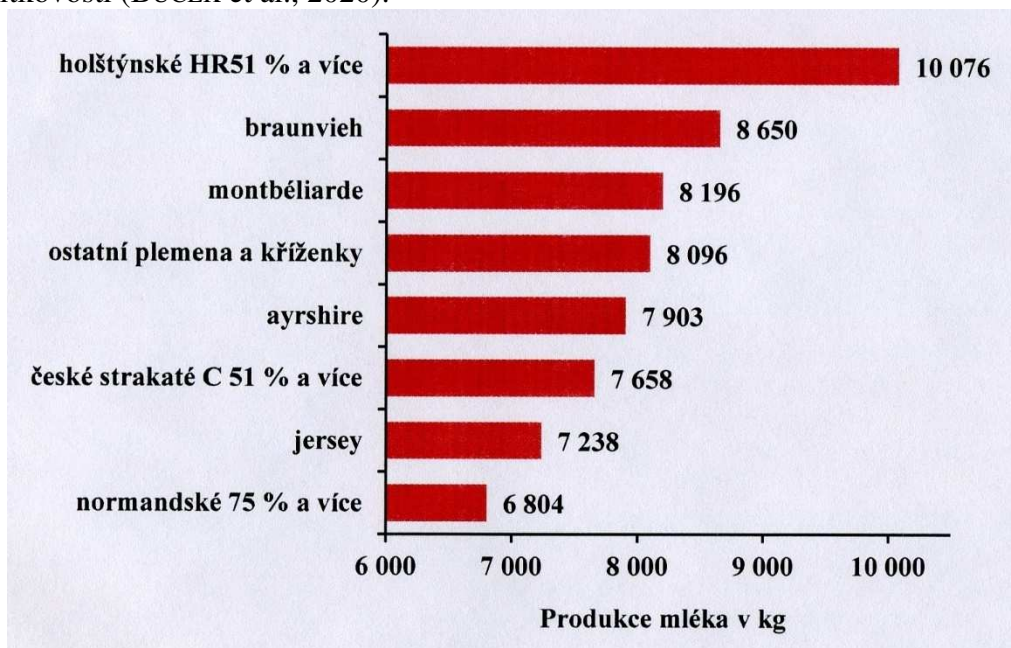
S rozšiřováním spektra rutinně, laboratorně měřených mléčných ukazatelů však vzrůstá, vedle šlechtitelských cílů, také význam operativního vyhodnocování této databáze pro účely poradenství ke kvalitě mléka a k prevenci mlékařských rizik a ztrát na dojivosti nebo zhoršené reprodukce a dlouhověkosti, jako výskytu produkčních poruch dojnic. KU je tak, jako nositelka dat o zvířatech pro účely šlechtění, tzn. zlepšování užitkových vlastností zvířat a kvality surovin živočišného původu, zapojena v důležité síti účelného transferu informací. Příklady některých vybraných aktuálních výsledků jsou uvedeny v Obr. 2 a 3.



Obr. 2 Dojivost a základní složky mléka za normovanou laktaci (v kg mléka) v české kontrole mléčné užitkovosti (BUCEK et al., 2020).



Obr. 3 Dojivost za 305 dní laktace (v kg mléka) plemen dojnic v české kontrole mléčné užitkovosti (BUCEK et al., 2020).



Počet somatických buněk, jako zdravotní ukazatel dojnic, je v kontrole jejich mléčné užitkovosti laboratorně sledován již dlouhodobě, ovšem procento zapojení krav do tohoto typu analýzy bývalo dlouhou dobu (cca 1998 - 2014) od cca 45 do 70 %. Až v posledním období, restrukturalizací cenové nabídky analýz, bylo toto zapojení zvýšeno na 100 % (osobní sdělení, KUČERA, 2021).

KUČERA (2020) zmínil nedávný harmonogram zjednodušení manipulace se vzorky a ošetření vzorkovnic a zavedení využití elektronické evidence vzorků při jejich odběru prostřednictvím čárkového kódu, což umožnilo zjednodušení kontroly a přenosu dat.

### ***Význam analýz vlastností a kvality syrového mléka***

Syrové mléko je významná potravinová surovina. Podle země nebo lokálních podmínek je více nebo méně placeno podle kvality, která je definována normami a v důsledku toho celou řadou mléčných ukazatelů (např. celkový počet mikroorganismů, počet somatických buněk, obsah tuku a bílkovin, bod mrznutí mléka atd.). Podle některých složek a vlastností mléka se také šlechtí mléčný skot (metody populační genetiky) na složení mléka, efektivitu mléčné produkce nebo zdravotní stav krav, resp. jejich rezistenci vůči produkčním chorobám (např. mastitidám). Výsledky referenčních a rutinních analýz mléka jsou tedy konkrétně využívány pro řadu zdravotních a hospodářských účelů a činností:

- pro kontrolu kvality surovin v potravinářství a potravin v humánní výživě, tedy bezpečnost potravinových řetězců;
- pro zpeněžování mléka podle kvality na rozhraní prvovýroby a zpracovatelského průmyslu;
- pro účely řízení zpracovatelských technologických procesů a kontroly jejich výtěžnosti, tedy efektivity;
- pro účely hospodářsky determinované selekce při šlechtění mléčného skotu a následně pro obchod s plemenným materiálem;
- pro kontrolu v rámci prevence nedostatků základní (energeticko-dusíkaté) vyváženosti výživy dojnic i zhoršení jejich zdravotního stavu;
- pro poradenství v prvovýrobě mléka;
- v neposlední řadě i pro stanovení podmínek světového obchodu s mlékem.

Z uvedeného výčtu je zcela zřejmé, že systém referenčních a rutinních mléčných laboratoří hraje významnou, ne-li zásadní, roli v podpoře kvality a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce. Údaje ze vzorku mléka, jako jsou hlavní složky, počet somatických buněk (PSB), močovina a ketolátky hrají zásadní roli při řízení stáda (LACTANET, 2021). To zvyrazňuje potřebu kontroly kvality ošetření a transportu vzorků mléka. Sledování a vyhodnocování kvality syrového mléka pomáhá plnit důležitou společenskou zakázku (BAUMGARTNER et al., 2000). Bezpečnost a kvalita mléčného potravinového řetězce jsou důležitými aspekty ochrany veřejného zdraví.

### ***Význam věrohodnosti výsledků analýz syrového mléka v mlékařství***

Ošetření vzorků mléka po odběru a transport do laboratoře (konzervace, kontrola teploty, čas) jsou problémy, jejichž zvládnutí náleží do systému kontroly věrohodnosti výsledků analýz. Věrohodnost výsledků referenčních a následně rutinních analýz složení a hygienické kvality mléka v mlékařství, pro systém KU a pro systém kontroly kvality mléka, je nepochybně důležitá pro hospodářské účely.

V praxi ovšem někdy vznikají z komerčního hlediska sporné situace ohledně věrohodnosti výsledků. Zde však objektivita techniky srovnávání případného výsledkového rozdílu nezřídka není zcela zajištěna. Proto a přesto se intenzivně pracuje na zlepšení dané otázky. Mléčné laboratoře se sjednocují a centralizují, což je výhodné pro uplatnění jednotných referenčních postupů a standardů. Spolupracují v sítích (GRAPPIN, 1987, 1993; COVENEY, 2001), sjednocují metodické postupy a zintenzivňuje se kontrola věrohodnosti (správnosti) výsledků.

Relevantní mléčné laboratoře akreditovaly své postupy a ročně podléhají akreditačním auditům. Akreditované laboratoře zavedly systém kontroly jakosti, musí mít, jak známo, vypracovanou příručku jakosti a kontrolovatelný systém zajištění kvality výsledků analýz. To je celá řada objektivizujících kroků za posledních deset roků. Tím není ani zdaleka řečeno, že jsou zvládnuta všechna úskalí systému, nebo že výsledkové rozdíly nebudou existovat.

Takový stav nemůže nastat ani teoreticky ani prakticky, rozdíly však mohou být minimalizovány.

Věrohodnost výsledků PSB je základem pro efektivitu zpracování moderních monitorovacích algoritmů pro efektivnější exploataci ukazatele PSB v praxi:

- algoritmus predikce neantibiotického odstavu (zasušení) krav podle dynamiky PSB a dalších mléčných ukazatelů v laktaci (individuální vzorky mléka);
- algoritmus horizontálního klouzavého srovnávání dynamiky kvality syrového mléka pro prvovýrobce (bazénové vzorky mléka).

Vzhledem k předchozí zkušenosti, že PSB patří k nejcitlivějším mléčným ukazatelům na transport a ošetření vzorků mléka v KU ve smyslu zachování věrohodnosti výsledků a skutečnosti, že souběžně dochází k úpravě podmínek v transportu vzorků v KU, ukázala se urgentní potřeba nově validovat a kontrolovat podmínky tohoto transportu. Důležité je zde ověřit kontrolu a dohledatelnost časového bodu a místa setrvávání transportovaných individuálních vzorků mléka v KU stejně, jako možnosti a podmínky efektivního časového harmonogramu transportu a techniky ošetření vzorků k zajištění věrohodnosti výsledků stanovení PSB.

### ***Mlékařský analytický systém a základní mléčné ukazatele***

Aby výše uvedenou zakázku mohly mlékařské laboratoře v České republice plnit, jsou převážně akreditovány podle mezinárodního standardu ČSN EN ISO 17025 a naplňují tak požadovanou realizaci systému kontroly kvality analytické práce. Je to rovněž proto, že časem obecně vzrostly nároky na kvalitu analytické práce a věrohodnost výsledků laboratorních analýz. Podle příslušných standardů je závaznou součástí akreditace tzv. validace analytických metod. Součástí validace je odhad nejistoty výsledků měření (SUCHÁNEK et al., 1999), tzv. rozšířené kombinované nejistoty výsledků měření, kterou jsou akreditované laboratoře permanentně povinný uvádět u svých výsledků.

Pro analýzy v mlékařství platí obecně řada specifických formulací, omezení a konvencí právě proto, že se jedná o biologicky proměnlivý materiál a zčásti také proto, že i při uplatnění různých separačních technik jde většinou o analýzy na pozadí variabilní multikomponentní matrice. To může být pro mnohé mlékařské analytické metody, zejména optické, zdrojem řady nežádoucích mezikomponentních interferencí, které je třeba vhodně eliminovat, často matematicky, při vyjadřování konkrétního výsledku. V mlékařské analytické práci totiž chybí něco, co lze třeba v analytické chemii přeneseně označit za zlatý standard (přeneseno z monetární teorie). Tedy existence analytického standardu na bázi roztoku jedné látky v destilované vodě (nebo jiném rozpouštědle) o přesně známé koncentraci, kterou lze metodicky-kalibračně, stejným postupem, aplikovat po značně dlouhé období beze změny v analytické práci.

Jak je tento mlékařský laboratorní systém charakterizován? K základním rysům patří:

- mlékařské laboratoře, referenční i rutinní, jsou nyní sdruženy do víceúrovňových (nejčastěji tři hladiny) pracovních sítí a to na národní i mezinárodní úrovni (GRAPPIN, 1993; HANUŠ et al., 1998, 2004) pro možnost kontroly kvality analýz;
- v systému existuje převaha metod nepřímých nad přímými, zejména pro vysoký výkon;
- nezbytnost pravidelných kalibrací nepřímých metod podle výsledků metod referenčních z výše uvedeného důvodu;
- neexistence tzv. „zlatého standardu“ u většiny mlékařských metod;
- velké série zpracovávaných vzorků (jak individuálních v kontrole užitkovosti tak bazénových v kontrole kvality mléka) pravidelně sbíraných z lokalit v legislativně nebo smluvně daných intervalech (den až měsíc, nejčastěji dva týdny);

- vysoký stupeň automatizace a robotizace laboratorní instrumentace;
- hodinový výkon přístrojů nezářídka od 300 do 500 vzorků mléka.

V poslední době poklesl výrazně počet mléčných laboratoří (pro individuální i bazénové vzorky mléka), vzrostl jejich výkon a počet analyzovaných ukazatelů. To bylo provázeno následujícími jevy:

- rostl výkon analytické a výpočetní techniky;
- bylo zvýšeno využití drahé analytické instrumentace;
- byla provedena modernizace;
- zvýšila se bezpečnost provozu pro životní prostředí;
- byly sníženy jednotkové náklady na analýzy;
- byly zvýšeny celkové náklady na analýzy (objem analýz a počet ukazatelů).

Pro pravidelné vyhodnocování kvality mléka (bazénové a individuální vzorky) jsou nyní obvykle sledovány následující obligatorní i fakultativní ukazatele: - obsah tuku (T; %); - obsah hrubých bílkovin (B; %); - obsah sušiny tukuprosté (STP, nebo laktózy (L, monohydrát), jako součást STP; %); - obsah kaseinu (K; %); - bod mrznutí mléka (BMM; °C); - koncentrace mléčné močoviny (M; mmol.l<sup>-1</sup>, mg.100ml<sup>-1</sup>); - látkový obsah volných mastných kyselin (VMK; mmol.100g<sup>-1</sup> mléčného tuku, nebo mmol.kg<sup>-1</sup> mléka); - počet somatických buněk (PSB; 10<sup>3</sup>.ml<sup>-1</sup>); - celkový počet mezofilních mikroorganismů (CPM; 10<sup>3</sup>CFU.ml<sup>-1</sup>; CFU = colony forming unit); - výskyt inhibičních látek v mléce (antibiotik, musí být negativní pro použití mléka ve standardní kvalitě).

Ukazatele lze rámcově rozdělit na složkové (chemické), fyzikální, mikrobiologicko-hygienické a technologické. Rovněž existují další méně sledované doplňkové ukazatele kvality mléka: - titrační kyselost (SH; ml×2,5 mmol.l<sup>-1</sup> roztoku NaOH); - aktivní kyselost (pH); - kysací schopnost (KS; hodnota jogurtového testu v jednotkách SH); - koncentrace kyseliny citrónové (KC; mmol.l<sup>-1</sup> nebo v %); - koncentrace acetonu (A; mg.l<sup>-1</sup>); - počet koliformních bakterií (CFU.ml<sup>-1</sup>); - počet psychrotrofních bakterií (10<sup>3</sup>CFU.ml<sup>-1</sup>); - počet termorezistentních bakterií (10<sup>3</sup>CFU.ml<sup>-1</sup>); - přítomnost anaerobních sporulujících mikroorganismů. Smluvně lze sledovat např. i syřitelnost a tak podobně.

Spolu s postupným rozšiřováním portfolia stanovovaných analytů v mléce (tuk → bílkoviny → laktóza → sušina tukuprostá → počet somatických buněk → močovina → aceton → betahydroxybutyrát, atd.) v KU za posledních cca 50 roků rostl i význam mléčných laboratoří v systému KU.

Poslední období je v KU manažersky ve znamení hledání cest k udržení kvality analýz v mlékařství a zároveň redukce nákladů na přání uživatelů výsledků (farmářů). Laboratorní systém v české KU byl poměrně podrobně popsán z hlediska analytických a statistických metodik, funkce, spektra činností i kontroly kvality postupů a výsledků (HANUŠ et al., 2007, 2008 a, 2009; všechny uvedené certifikované metodiky 2006 a, b, 2008 c, 2019).

### ***Význam ošetření vzorků mléka po odběru do analýzy***

Chlazení potravin je jedním z velmi známých, starých, v podstatě biologických, postupů jejich konzervace, tedy prodloužení trvanlivosti. Je průběžně využíváno i při podpoře stabilizace vzorků potravin, včetně mléka, při jejich transportu do laboratoře a uchování ke kontrole kvality. Ačkoliv to není obecně známo, je doloženo, že chlazení potravin ledem bylo využíváno již 400 let před naším letopočtem v Persii, tedy téměř před 2 500 lety, za využití úchoven ledu „jakčal“, jak dokládají výsledky archeologického výzkumu architektury starověku. To bylo a je významné v oblastech s extrémně teplým klimatem nebo s výraznými výkyvy teploty. Konzervace potravin chlazením v severských zemích byla pak vývojovou, technologickou výhodou a rovněž samozřejmostí.

Významnou (kritickou) periodou pro vzorky mléka je doba od odběru do analýzy, obvykle zahrnující i transport, z pohledu času, průběhu teploty a aplikace konzervačního prostředku, které mají zajistit setrvání originálního stavu materiálu (jeho organického složení) pro účely analýzy. Mléko je, jak známo, vhodným prostředím pro vývoj mikroorganismů a následnou degradaci jeho organických složek. Obecně jsou na nárůstové změny nebo destrukční účinky při špatném ošetření vzorků citlivé zejména takové mléčné ukazatele, jako je celkový počet mikroorganismů a počet somatických buněk, který je významným ukazatelem zdravotního stavu mléčných žláz dojníc (z hlediska frekvence výskytu zejména subklinických mastitid), hygieny dojení, ztrát dojivosti a propadu cen za kvalitu mléka (KVAPILÍK a RŮŽIČKA, 2009; KVAPILÍK a SYRŮČEK, 2013; KVAPILÍK, 2014 a, b; KVAPILÍK et al., 2015 a, b, 2016, 2017 a, b). Proto, pokud neinterferuje výrazně do výsledků analýz, je použití konzervačního prostředku obvyklé, přičemž výhodou je souběžná stabilita nízkých teplot během uložení vzorku a zkrácení času prodlení do analýzy na minimum. Tyto parametry byly stále zlepšovány od zavedení analýz mléka (tuk) do KU až do dnešních dnů. Tak se dospělo od dřevěných úložných boxů pro vzorkovnice a zaslání poštou nebo dráhou trvajícím v průměru 3 až 4 dny bez teplotního krytí až po chladové uložení a svoz konzervovaných vzorků mléka do 2 dnů. V různých zemích je tato otázka řešena různě, ale cíle vývoje jsou stejné.

Od počátku byl v těchto systémech transportu vzorků do rutinních mléčných laboratoří zájem o popis stabilizačních schopností konzervačních prostředků s cílem minimalizovat vlivy na zdraví a životní prostředí. Byly zkoušeny vzorky mléka na stabilitu složení a vlastností (KVAPILÍK a SUCHÁNEK, 1974; BUCHBERGER a KIERMEIER 1975; ANONYM, 1977; WEAVER et al., 1977; ARDÖ, 1979, 1982; NG-KWAI-HANG a HAYES, 1982; PETTIPHER et al., 1982; RAPP a MÜNCH, 1984; BIGGS et al., 1984; SJAUNJA, 1984 a, b; SJAUNJA et al., 1984; KROGER, 1985; COLEMAN a MOSS, 1989; SZIJARTO et al., 1990; BENDA, 1995; BAUMGARTNER a LANDGRAF, 2005; ZAJÁC et al., 2015, 2016) po různý čas, bez konzervace a s různými konzervačními prostředky (nejčastěji: dvojchroman draselný; azid sodný; bronopol = 2-Brom-2-Nitropropan-1,3-Diol), v různých teplotách (chladničkové a pokojové) i zamražené, pro různé mléčné ukazatele (nejčastěji: tuk; bílkoviny; laktóza; počet somatických buněk; močovina). Další autoři (MICHALAK et al., 1978; VINES et al., 1986; VOORT et al., 1987; GRAPPIN, 1987, 1993; VALENBERG, 1990; KUPKA, 1997; SUCHÁNEK et al., 1999; COVENEY, 2001) se zabývali statistickými metodami kalibrací instrumentální, mlékařské, analytické techniky, hodnocením věrohodnosti výsledků analýz vzorků mléka a odhady výsledkových nejistot a výkonnostním testováním analytické způsobilosti (proficiency testing).

Pozitivní vývoj za posledních 10 let v ČR, v kontrole konzervace a transportu vzorků mléka k analýze v systému KU, ve smyslu jejich označení, evidence, dohledatelnosti a zkrácení času, uvedl KUČERA (2020). Že jsou tyto otázky stále aktuální, dokládají práce ZAJÁC et al. (2015, 2016), kde bylo testováno a zjištěno: - účinek různých koncentrací čtyř různých konzervačních látek, dichroman draselný ( $K_2Cr_2O_7$ ), Azidiol (azid sodný,  $NaN_3$ ), bronopol (2-brom, 2-nitro, 1, 3, propandiol,  $C_3H_6BrNO_4$ ) a Microtabs II (kompozitní prostředek s fortifikací bronopolu); - analýzy mléka pomocí infračervené spektroskopie ve středové oblasti (MIR, MIR-FT); - konečné koncentrace konzervačních látek ve vzorcích syrového mléka činily 0,005 %, 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % a 1 %; - čerstvé kravské mléko konzervované 2 a 24 hodin po dojení; - koncentrace konzervačního činidla měla významný účinek ( $P < 0,005$ ) na výsledky laboratorních analýz; - je třeba použít správnou koncentraci pro běžnou konzervaci vzorků.

Obecně, většina rutinních, mlékařských, laboratorních systémů, po období používání zdravotně problematického (WEAVER et al., 1977) dichromanu draselného a potenciálně explozivního azidu sodného (obvykle v tabletách), dnes používá různé formy bronopolu (tekuté a tabletové) v konečné koncentraci běžně 0,02 až 0,04 %. Eventuelní vliv konzervace, který je minimální, je kompenzován použitím konzervovaných referenčních

(kalibračních) standardů pro instrumenty (MIR, MIR-FT), když tyto jsou referenčními metodami analyzovány, pro uvedení referenčních výsledků, v nekonzervovaném stavu – automatická kompenzace. Bronopol se ve studiích zároveň jevil zdravotně nejbezpečnější pro personál, s nejmenším vlivem na životní prostředí.

## **2) Cíl metodiky ošetření a transportu vzorků mléka v KU**

Cílem metodiky je retrospektivně (srovnáním, analýzou a syntézou předchozích relevantních poznatků) posoudit alternativy kontroly kvality vzorků mléka v periodě od odběru do analýzy, v systému kontroly mléčné užitkovosti, pro zajištění věrohodných výsledků analýz. Pozornost je třeba věnovat způsobu konzervace a kontrole času a teploty v tomto, pro vzorky mléka, kritickém období. Spolehlivá kontrola nad stavem vzorků mléka je významná zejména pro věrohodnost stanovení počtu somatických buněk.

## **3) Vlastní metodika ošetření a transportu vzorků mléka v KU**

### ***A) Výsledky analýzy kontrolních systémů transportu vzorků v KU***

Byla doložena schopnost systému KU spolehlivě kontrolovat transport vzorků mléka do laboratoře a zajistit nižší časovou prodlevu do okamžiku chladového transportu (KUČERA et al., 2021): ze statistik ČMSCH, a.s. za rok 2021 vyplynulo, že při dodržení všech pokynů a dohodnutých postupů všemi účastníky zmíněného řetězce se čas od předání vzorků na svozné místo po zajištění výsledku v laboratoři dostává doba zpracování pod úroveň 48 hodin. Průměrná délka prodlení vzorků na svozných místech za I. - VIII. 2021 činila pak 9 hod a 17 minut.

### ***B) Možnosti ošetření vzorků mléka v KU od odběru po transport k analýze***

Naše pracoviště se dlouhodobě podílelo na analytické podpoře postupů mléčných laboratoří ČMSCH v systému KU v ČR (limitovaný výběr relevantních položek: HANUŠ a ŽVÁČKOVÁ, 1989; HANUŠ et al., 1992 a, b, c, d, 1998, 2003, 2004 a, b, 2006 a, b, 2007, 2008 a, b, c, 2009, 2019; GENČUROVÁ et al., 1993 a, b, 1994; BENDA, 1995; HERING et al., 2008 a, b; SOJKOVÁ et al., 2009; KLIMEŠOVÁ et al., 2021), a to od vývoje odběru, konzervace a transportu vzorků přes referenční a kalibrační činnosti pro analytickou techniku při postupně se rozšiřujícím spektru mléčných ukazatelů až po vývoj kontrolních mechanismů a relevantního výkonnostního testování analytické způsobilosti včetně jeho statistické podpory a kvalifikačního školení laboratorního personálu. Další výsledky našeho pracoviště k interpretaci dat v KU jsou obsaženy v materiálu ČMSCH, Souborné zásady KU 2014. Na základě těchto vývojových poznatků jsou sestaveny následující výsledky, závěry a praktická doporučení v oblasti ošetření a transportu individuálních vzorků mléka k analýze v systému KU, které byly druhotně zpracovány formou review až metaanalýzy. Při práci byly zohledněny relevantní standardní dokumenty (ČSN 57 0530, ČSN 57 0536, ČSN EN ISO/IEC 17025, ČSN ISO 8196-1, ČSN ISO 8196-2, ČSN ISO 8196-3, ČSN EN ISO 13366-1, ČSN EN ISO 13366-2).

Hygienické, ekologické a zdravotní problémy s konzervací vzorků mléka pro základní analýzu vedou ke stále snaze nalézt méně závadný chemický prostředek s dostatečným pokrytím časové stability vzorku, tedy takový, který po potřebnou dobu originální složení vzorku a neovlivní výsledek analýzy. Takovým minimálně rizikovým byl i Milkofix (M) na bázi sloučeniny stříbra. Jeho konzervační účinnost byla srovnána s dalšími činidly (konkrétní

výsledky v grafické a tabulkové příloze):  $K_2Cr_2O_7$  (C);  $NaN_3$  (A); bronopol (B). Použité koncentrace na 25 ml mléka byly následující: A 0,0085 g  $NaN_3$  a 0,063 g NaCl; B 0,005 g bronopolu a 0,05 g NaCl; C 0,033 g  $K_2Cr_2O_7$  a 0,067 g KCl v tabletě; M 0,125 g směsi. Zjištěná antibakteriální účinnost M se projevila pomalejším poklesem aktuální (aktivní) kyselosti mléka pH, resp. vzrůstem titrační kyselosti (SH) ve vzorcích s M oproti nekonzervovaným (N). Ze startovací hodnoty pH 6,3 klesla hodnota varianty N po dvou dnech (20 °C) na 3,8, u varianty M po devíti dnech na 4,9 a u varianty A po dvanácti dnech na 5,7. Pro SH vzrostla současně hodnota z 6,5 ( $2,5 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) na 28,6 u N, 22,3 u M, a 9,4 u A. Při uložení vzorků mléka při teplotě 4 °C byla tendence podobná, ovšem rozdíly mezi způsoby konzervace byly proti uložení při teplotě 20 °C poněkud zastřené. Normovaná hodnota SH 9,0 ( $2,5 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ ) pro měření na infraanalyzátoru byla překročena u vzorků N po 24 hodinách, u M po 4 dnech a u A po 12 dnech při teplotě 20 °C. Rovněž při sledování růstu mikroorganismů (celkový počet, CPM) byl tento pomalejší u M než u N, ale rychlejší než u vzorků varianty C. Generační doba CPM u N činila 1,6 hodiny, u M 2,4 a u C 7,9 hodiny. Délka lag fáze těchto smíšených kultur činila u M 24 hodin, u C 60 hodin a chyběla u varianty N. Prokázané antibakteriální účinky Milkofixu byly slabší než u A, bronopolu a C, což se projevilo i v hodnotách minimálních inhibičních koncentrací vůči *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (IN-test). Nejvyšší interferenční vliv konzervovadel na relevantní infračervenou spektroskopii (Milko-Scan 133 B, s technologií optických filtrů, ve střední oblasti IR) byl zaznamenán u Milkofixu pro laktózu v hodnotě 0,14 %. Tuto hodnotu je ještě možné kompenzovat kalibrací přístroje. Na základě těchto výsledků lze připustit při konzervaci vzorků mléka Milkofixem jejich měření maximálně do 4 dnů po odběru v uložení při teplotě 20 °C a do 9 dnů při teplotě 4 °C.

Ekologicky nezávadný preparát Milkofix (M) určený ke konzervaci vzorků mléka byl pro účely infračervené spektroskopie základního složení mléka srovnáván se vzorky nekonzervovanými (N) a konzervovanými azidem sodným (A), bronopolem (B) a dvojchromanem draselným (C) při teplotě uložení vzorků 20 °C (I) a 4 °C (II) po dobu 14 a 18 dní. Preparáty byly použity podle literárních doporučení. Použité koncentrace na 25 ml mléka byly následující: A 0,0085 g  $NaN_3$  a 0,063 g NaCl; B 0,005 g bronopolu a 0,05 g NaCl; C 0,033 g  $K_2Cr_2O_7$  a 0,067 g KCl; M 0,125 g. Byly použity 3 bazénové vzorky mléka, které byly každý den analyzovány na automatickém infračerveném spektroskopu Milko-Scan 133 B (Foss Electric, Denmark) na základní složení mléka (obsah tuku, hrubých bílkovina a monohydrátu laktózy). Grafickým vyhodnocením výsledků byly stanoveny doby přijatelné u jednotlivých způsobů ošetření mléka k získání použitelných analytických výsledků: N I = 0 dní; A I = 9; B I = 10; C I = 13; M I = 4; N II = 10; A II = 5; B II = 11; C II = 15; M II = 10. Výsledky pro Milkofix jsou v souladu s předchozími výsledky, kde byly určeny doby 4 a 9 dní. Doby do srážení vzorků mléka činily: N I = 1 den; M I = 10 dní. Vzorky A I, B I, C I a N II se nesrazily po 13 dní uložení, vzorky A II, B II, C II a M II po 17 dní. Systémem hodnotících kritérií bylo vytvořeno pořadí od nejvhodnějšího způsobu konzervace vzorků mléka pro uvedený účel: 1. C II; 2. C I; 3. B II; 4. B I; 5. M II; 6. N II; 7. A II; 8. M I; 9. N I.

Ekologicky nezávadný preparát Milkofix (M; 0,125 g) určený ke konzervaci vzorků mléka byl pro účely infračervené spektroskopie základního složení mléka srovnáván se vzorky nekonzervovanými (N) a konzervovanými azidem sodným (A; 0,0085 g  $NaN_3$  a 0,063 g NaCl), bronopolem (B; 0,01 g bronopolu a 0,09 g NaCl) a dvojchromanem draselným (C; 0,033 g  $K_2Cr_2O_7$  a 0,067 g KCl). Vše platí pro 25 ml mléka. Měření počtu somatických buněk (PSB) byla provedena na fluoro-opto-elektronickém poloautomatickém mikroskopu Fossomatic 90 (Foss Electric, Denmark). Byly nalezeny významně vyšší hodnoty PSB ( $P < 0,01$ ) v bazénových vzorcích mléka konzervovaných oproti N hned po odběru o: A 6,0 %; B,

C a M 12,9 %. Po jednom dni uložení vzorků mléka N při teplotě 4 °C byly tyto rozdíly nevýznamné ( $P > 0,05$ ), takže výsledky vzorků N, A, B, C a M lze považovat za odpovídající skutečnosti a vzájemně srovnatelné. Nebyl sledován vliv koncentrace konzervačních prostředků na výsledky v PSB, neboť hodnoty konzervovaných vzorků mléka o různých koncentracích se lišily nevýznamně ( $P > 0,05$ ) od vzorků N. Za prakticky použitelné při popsání způsobu ošetření (tj. konzervace a teplota: I = 20 °C; II = 4 °C) vzorků mléka lze považovat tyto doby uložení: N I = 1 den; A I = 3 dny; B I = 7; M I = 3; N II = 9; A II = 15; B II = 17; C II = 17; M II = 17 dní. Pro B II, C II a M II pravděpodobně i déle. Milkofix dosáhl dob údržnosti výsledků vzorků delších než N, ale většinou kratších než ostatní konzervace. Bylo vyhodnoceno následující pořadí vhodnosti způsobů ošetření vzorků: 1. C II; 2. B II; 3. M II; 4. A II; 5. N II; 6. C I; 7. B I; 8. A I; 9. M I; 10. N I. V obou teplotách uložení bylo u C dosaženo nejlepších výsledků, proto lze dvojchroman draselný přednostně doporučit, i když při jeho náhradě v rutinních analýzách méně škodlivým (zdravotně a prostředově) konzervačním prostředkem, alespoň k přípravě kontrolních (pilotních) a referenčních vzorků pro přístroje nepřímého stanovení PSB (fluoro-opto-elektronické čítače v provedení s nekonečným filmem na rotujícím disku nebo jako průtočná cytometrie).

Byl testován tabletový konzervační prostředek vzorků mléka Broad Spectrum Microtabs (BSMT) s ostatními konzervanty a nekonzervovanými vzorky (N) pro určení hlavních složek mléka (obsah tuku, hrubých bílkovin a monohydrátu laktózy) a počtu somatických buněk (PSB): I = Betuna, tableta o hmotnosti 120 mg s obsahem 10 mg bronopolu (Br); II = dvojchroman draselný, 100 mg tableta (Merck, Darmstadt, Germany) s obsahem 33 mg účinné látky (D); III = BSMT, 18 mg mikrotableta, s obsahem 10 mg monopolu a 0,45 mg natamycinu. Konzervace byla použita pro 25 ml mléka, všechna měření byla provedena dvakrát. Složení mléka bylo určeno infračervenou spektroskopií (Milko-Scan 133 B, Foss Electric, Denmark) a PSB fluoro-opto-elektronicky (Fossomatic 90, Foss Electric, Denmark). Bylo použito 6 bazénových vzorků mléka uložených při teplotě 20 a 4 °C. Vzorky N byly sraženy již 2. den (20 °C), a při 4 °C 9. den. U konzervovaných vzorků mléka (20 °C) byly výsledky prakticky použitelné ještě 7. den. Při 4 °C byly větší odchylky zaznamenány u vzorků N od 4. dne. U konzervovaných vzorků byly výsledky použitelné cca do 8. dne. Pro výsledky PSB byl při teplotě 20 °C zaznamenán trvalý pokles, při 4 °C byly výsledky konzervovaných vzorků použitelné celých 18 dní sledování.

Byl studován vliv poklesu (resp. fermentace) v obsahu laktózy během uložení mléka za různých podmínek na věrohodnost výsledků získaných infračervenou spektroskopií s přístrojem Milko-Scan 133 B (ve středové oblasti IR spektra s technologií optických filtrů). V první části byly vypočteny významné korelační koeficienty ( $P < 0,001$ ) mezi změnami obsahu laktózy k tuku a bílkovinám  $r = -0,59$ , resp.  $-0,73$ . To naznačuje, že úbytek v obsahu laktózy o 0,1 % zachycený infračervenou spektroskopií a způsobený jejím rozkladem je provázen domnělým vzrůstem v obsahu tuku a bílkovin  $r = -0,96$  a  $-0,96$  ( $P < 0,001$ ). Mezi vývojem získané titrační kyselosti (SH) a změnami v obsahu tuku (F), bílkovin (P) a laktózy (L) byly pak hodnoty korelačních koeficientů:  $r = 0,95$ ;  $0,95$ ;  $-0,99$ ; ( $P < 0,001$ ). Lze konstatovat, že uvedený zdánlivý vzrůst obsahu F a P je možné z 92,2 % vysvětlit poklesem v obsahu laktózy, který je z 98,0 % příčinou vzrůstu získané titrační kyselosti. Vzrůst SH pak z 90,3 % podmiňuje zdánlivý vzrůst obsahu F a P. Pokles v odečtu obsahu L o 0,1 % a vzrůst získané kyselosti o 1 °SH byl provázen vzrůstem obsahů F a P o 0,09 a 0,02 %, resp. o 0,02 a 0,005 %. S poklesem odečtu v obsahu L o 0,1 % vzrostla kyselost o 4,1 °SH. Dále byla změřena interferenční absorpce neutralizovaného roztoku kyseliny mléčné v mléce, jako nejpravděpodobnějšího produktu mikrobiální fermentace laktózy v uložených vzorcích. Přítomnost soli kyseliny mléčné v normálním prostředí mléka zvýší zdánlivě odečet F a P



filtrickou infračervenou spektroskopii a sníží odečet L: při koncentraci 0.5 % to znamená 0,21 % F, 0,26 % P a -0,27 % L. Výsledky naznačují zdanlivý vzrůst obsahu tuku a bílkovin a zrychlený pokles obsahu laktózy v důsledku fermentace a hromadění jejich produktů, jako např. kyseliny mléčné, propionové a dalších, ve stárnoucím vzorku mléka. Uvedené jevy mohly být částečně zdrojem nepravděpodobně zvýšených obsahů bílkovin, zjišťovaných dříve v rutinní analytické praxi u skladovaných vzorků mléka.

Byl sledován vliv potencionálních konzervačních činidel za pokojové teploty uložení vzorků mléka po dnech na rozvoj původní mléčné mikroflóry (BENDA, 1995). Byla ověřena a validována konzervační činidla vzorků mléka používaná pro instrumentální analýzu složek mléka z mikrobiologického hlediska. Z konzervačních činidel byly sledovány dvojchroman draselný (Merck), přípravek Milkofix na bázi koloidního stříbra (Tržický), azid sodný (Janssen Chimica) a Bronopol (PSL Microtabs). Skupiny mikroorganismů (mezofilní mikroorganismy, koliformní mikroorganismy, bakterie mléčného kvašení, enterokoky a stafylokoky) byly vybrány s ohledem na jejich předpokládaný výskyt při přirozené kontaminaci mléka. Mezi přípravky byly shledány vysoce průkazné rozdíly v konzervačním účinku. Nejlepší konzervační schopnosti vykazoval pro všechny skupiny mikroorganismů přípravek Bronopol, poněkud horší konzervační účinek měl dvojchroman draselný. Azid sodný a přípravek Milkofix měly podobné konzervační vlastnosti; shodovaly se v působení na mléčné bakterie, enterokoky lépe inhiboval Milkofix a mezofilní mikroorganismy naopak azid sodný. Podle citlivosti na použitá konzervační činidla lze rozdělit studované skupiny bakterií na organismy citlivé ke konzervantům, kam patří stafylokoky a koliformní mikroorganismy a organismy tolerantní, schopné růstu i v přítomnosti konzervačních látek, kam lze zařadit enterokoky, bakterie mléčného kvašení a mezofilní mikroorganismy.

Byly srovnány výsledky mezofilních, psychrotrofních a koliformních bakterií v bazénových vzorcích syrového kravského mléka analyzovaného na farmě a po svozu do laboratoře (KLIMEŠOVÁ et al., 2021). Vzorky pocházely ze sedmi mléčných farem a byly dopraveny do laboratoře za různých teplotních podmínek bez ošetření a s ošetřením konzervačním činidlem. Hodnoty mezi vzorky zpracovanými přímo na farmě a v laboratoři, dále mezi chlazenými nekonzervovanými a nechlazenými konzervovanými vzorky byly srovnatelné a jejich rozdíly byly statisticky nevýznamné.

### ***C) Konstatování a doporučení k ošetření vzorků mléka v KU od odběru po transport k analýze***

Na základě uvedených přehledů situace, získaných poznatků, výsledků a dosažených názorů je možné shrnout následující konstatování a doporučení ve věci optimálních postupů ošetření odebraných vzorků mléka v kontrole užitkovosti za daných podmínek v ČR k dosažení jejich dobré stability a věrohodnosti následných analytických výsledků (konstatování a závěry byly vyvozeny z výše srovnávaných textů a relevantních a korespondujících tabulek (1 až 22) a grafů (1 až 8) v grafické příloze metodiky CM41: HANUŠ a ŽVÁČKOVÁ, 1989; HANUŠ et al., 1992 a, b, c, d, 1998, 2003, 2004 a, b, 2006 a, b, 2007, 2008 a, b, c, 2009, 2019; GENČUROVÁ et al., 1993 a, b, 1994; BENDA, 1995; HERING et al., 2008 a, b; SOJKOVÁ et al., 2009; KLIMEŠOVÁ et al., 2021):

- pro eliminaci případného interferenčního efektu použitého konzervačního činidla vzorků mléka je výhodné provádět relevantní kalibrace mlékařské analytické techniky pro nepřímé měření mléčných ukazatelů přímo s takto ošetřenými vzorky, aby interferenční efekt byl automaticky kompenzován;

- při zohlednění případných zdravotních rizik laboratorního personálu, nároků na nepoškození životního prostředí a potřeby účinné stabilizace vzorků mléka se jeví konzervace bronopolem jako nejefektivnější. Existují tedy sice šetrnější typy konzervace, avšak s výrazně nižší účinností, proto bronopolová konzervace je nejlepším kompromisem pro pokrytí všech nároků;
- bronopol, vedle ostatních konzervantů, prokázal druhé nejlepší pokrytí (přičemž nejúčinnější dvojchroman draselný je poměrně diskvalifikován ostatními zdravotními a prostředovými riziky) stability vzorků, při pokojové teplotě (bez chladové podpory) spolehlivě cca 4 dny (kvalifikovaným odhadem provedená korekce na skutečně experimentálně zjištěnou rezervu 10 dní pro hlavní složky mléka a 7 dní pro PSB) pro hlavní sledované složky mléka a počet somatických buněk jako předmětné analyty systému kontroly mléčné užitkovosti;
- v systémech ošetření vzorků mléka v kontrole užitkovosti je třeba dbát nepřekročení rizikových limitů (konzervace/teplota), neboť případná mikrobiální degradace mléka by mohla zapříčinit nežádoucí změny ve výsledcích analýz všech složek mléka nebo PSB.

#### 4) Závěr certifikované metodiky ošetření a transportu vzorků mléka v KU

Retrospektivní kompilací a následnou analýzou, převážně našich vlastních experimentálních výsledků a zdrojů, byl proveden kvalifikovaný odhad pro šetrnou, ale ekonomicky efektivní, redukci krátkodobých chladových kapacit (zdrojů) v systému transportu vzorků mléka v kontrole užitkovosti dojnic při zachování jejich kvality pro laboratorní analýzu složek a počtu somatických buněk.

Byla prokázána schopnost konzervačních činidel individuálních vzorků mléka v kontrole užitkovosti, zejména obecně používaného bronopolu (při běžné konečné koncentraci cca 0,03 % (0,02 – 0,04 %); 2-Brom-2-Nitropropan-1,3-Diol), spolehlivě stabilizovat výsledky složení mléka po minimálně 4 dny při pokojové teplotě uchování jeho vzorků. Byla analyzována a doložena schopnost systému kontroly užitkovosti, po periodě zdokonalení jeho technického vybavení k evidenci od odběru přes uložení až po přepravu vzorků do laboratoře, spolehlivě kontrolovat transport vzorků mléka a zajistit nižší časovou prodlevu do okamžiku chladového transportu rámcově cca do 24 hod.

Jistota minimálně čtyřdenní konzervační stability vzorků mléka v kontrole užitkovosti při pokojové teplotě časově výrazně překrývá předpokládaně nezbytnou časovou prodlevu za těchto teplotních podmínek do regulérního chladového transportu. Uvedené naznačuje možnost efektivního snížení ošetrovacích nákladů vzorků mléka při zachování věrohodnosti analytických výsledků v kontrole užitkovosti.

V případě potřeby redukce části chladové podpory vzorků mléka v kontrole užitkovosti, v současných podmínkách, v periodě od odběru do analýzy, z ekonomických důvodů, je tato možná v případě dosažení a prokázání krátké časové prodlevy v uvedené periodě, kdy relevantní, aplikovaný, konzervační prostředek prokazatelně spolehlivě zvládá stabilizaci mléka a omezení případných, rizikových, degradačních procesů.

Případná akceptovatelná redukce v technologii chladového zabezpečení v systému svozu vzorků mléka v KU povede ke zjednodušení postupu a následně přispěje k redukci provozních (materiálových) nákladů na KU, spotřeby elektrické energie a tím také k podpoře ochrany životního prostředí.

### **III) Srovnání „novosti postupů“ a předání certifikované metodiky: Alternativy ošetření a transportu vzorků v kontrole mléčné užitkovosti pro věrohodné výsledky analýz**

- vyvinutá certifikovaná metodika byla předána do užívání systému kontroly laboratorní práce v mléčné laboratoři kontroly užitkovosti ČMSCH a. s. v elektronické i písemné formě 31. 1. 2022;
- jedná se o inovovaný a validovaný postup kontroly podmínek ošetření a transportu individuálních vzorků mléka v systému rutinní laboratoře kontroly mléčné užitkovosti pro podporu věrohodnosti získávaných analytických výsledků, efektivity šlechtitelské práce a kontroly zdravotního stavu mléčné žlázy dojnic. Výsledky jsou jednak rozšířením dosavadních poznatků (kvalita ošetření a transportu individuálních vzorků mléka v kontrole mléčné užitkovosti) a dále uvedením známých poznatků v nových souvislostech (inovovaná struktura kontroly podmínek ošetření a transportu individuálních vzorků mléka v kontrole mléčné užitkovosti);
- vývoj postupu a metody kontroly podmínek ošetření a transportu individuálních vzorků mléka v kontrole mléčné užitkovosti je zajištěn vlastními konkrétními výsledky a retrospektivní komparací a analýzou vlastních předchozích výsledků pracoviště. Vyhodnocením těchto výsledků a sestavením návrhů vznikl postup, který je metodickým podkladem pro mléčné laboratoře kontroly užitkovosti pro zajištění kvality analytických výsledků a auditu relevantních akreditačních orgánů v oblasti analýz mléka;
- uvedené postupy ověření a podpory spolehlivosti dat analýz mléka jsou již používány v souvislosti s vývojem situace kolem kontroly mléčné užitkovosti a až doposud byly v podstatě dílčím způsobem řešeny, ale poněkud odlišným postupem, nikoliv zde uvedeným způsobem.

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

- kontrola existence certifikované metodiky jako pracovního postupu pro podporu věrohodnosti získávaných analytických výsledků, efektivity šlechtitelské práce a kontroly zdravotního stavu mléčné žlázy dojnic a pro účely auditu akreditace;
- kontrola aplikace certifikované metodiky je proveditelná prostřednictvím revize dokladů o provádění kontroly podmínek transportu vzorků v kontrole mléčné užitkovosti v ČR a revize dokladů workshopů k zlepšování kvalifikace odborného laboratorního personálu (programy, PP-prezentace a jejich písemné poznámkové verze, prezenční listiny, personální certifikáty o absolvování) prostřednictvím organizace ČMSCH a.s. Hradištko;
- certifikovaná metodika postupu kontroly pro podporu věrohodnosti získávaných analytických výsledků, efektivity šlechtitelské práce a kontroly zdravotního stavu mléčné žlázy dojnic a pro účely auditu akreditace byla zpracována v šesti exemplářích a předána v kroužkové vazbě na příslušná pracoviště LRM Brno-Tuřany ČMSCH a. s. a do knihovny a na pracoviště Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. Praha a informace o ní na MZe a do RIV.

## V) Ekonomické aspekty

Ekonomický dopad je součástí kontroly mléčné užitkovosti a využití výsledků ve šlechtitelské práci a monitoringu zdravotního stavu krav. Plemenářskou práci u dojeného skotu lze efektivně realizovat pouze na základě spolehlivých výsledků analýz. Vyvinutý a testovaný postup podporuje tuto spolehlivost analytických výsledků kontroly užitkovosti pro potřeby kontroly dědičnosti. Na bázi plemenářské práce v chovu dojnic a poradenství ke zdravotnímu stavu dojnic může tvořit podíl do 2 % (s ohledem na celou KU) z efektu ve smyslu genetického zisku další generace dojnic. Uvedené je dáno redukcí běžných nedostatků způsobených případnou chybnou informací v KU. Objem případných ztrát z chyb v KU je ovšem obtížné vyčíslit konkrétněji. Na úrovni státu, při daném rozsahu a vlivu KU, může ročně přínos z redukce ztráty efektivity chybami činit částky v řádu statisíců.

Náklady na konkrétní zavedení a využití postupu uvedeného v metodice mohou pro uživatele ČMSCH a. s. činit podle kvalifikovaného odhadu v KU celkem 35 tis. Kč jednorázově (náklady na vyhodnocení faktorů chladového transportního řetězce vzorků mléka). Přínos pro uživatele (ČMSCH a. s.) je v podpoře spolehlivosti postupu kontroly režimu ošetření a transportu vzorků mléka a kvalifikace laboratorního personálu. Tento lze na nepřímých efektech kvalifikovaně odhadnout na 100 tis. Kč ročně při redukcí chybovosti výsledků analýz a prevenci případných sporných jednání. Tento efekt je opakovatelný po rocích. Zároveň, při možné redukcí nákladů na chladicí zařízení v řetězci transportu vzorků mléka v kontrole užitkovosti, může jednorázová úspora na předpokládaných nákladech pro nezbytnou rekonstrukci chladicího řetězce činit během tří roků cca 530 tis. (přepočteno na 15 roků životnosti zařízení) Kč pro uživatele metodiky (ČMSCH a. s.). Dále může být zohledněna roční úspora cca 25 tis. Kč nákladů na elektrickou energii a provoz zařízení (cca 60 ks chladniček), opakovatelná po rocích. Uvedené může přispět k redukcí nákladů na provoz kontroly mléčné užitkovosti.

## VI) Seznam použité související literatury

### 5) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky

- ANONYM: Use of sodium azide for the preservation of milk samples for fat and protein determination with Milko-Scan. *Dtsch. Molk. Zeitung*, 29, 1977, 910-911.
- ARDÖ, Y.: Bronopol as a preservative in milk samples. *Milchwissenschaft*, 34, 1979, 1, 14-16.
- ARDÖ, Y.: Bronopol as a preservative in milk samples for the determination of cell content using Fossomatic. *Milchwissenschaft*, 37, 1982, 139-142.
- BAUMGARTNER, CH. und Expertengruppe für Qualitätssicherung und Qualitätsmanagement: *Qualitäts 2000. Leitfaden für den Betrieb von Routine – Untersuchungsgeräten in Rohmilch – Prüfungslaboratorien*, 1. Ausgabe, Oktober 2000: 32.
- BAUMGARTNER, C.- LANDGRAF, A.: Deep frozen raw milk standards – The way from reference methods to reference system. 34th ICAR Session, May 28 – June 3, 2004, Sousse, Tunisia, EAAP Publication 113, 2005, 253-257.
- BENDA, P.: Vliv některých konzervačních činidel na přirozenou mikroflóru vzorků mléka. The effect of some preservatives on natural microflora in milk samples. *Vet. Med.-Czech*,

- 40, 1995, 11, 359-364.
- BIGGS, D. A.- SZIJARTO, L. F.- VOORT VAN DE, F. R.: Fresh milk sampling for centralized milk testing. *J. Dairy Sci.*, 67, 1984, 3085-3092.
- BUCEK, P.- KUČERA, J.- SYRŮČEK, J. et al.: Ročenka – Chov skotu v České republice. Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2019. ČMSCH a. s., 2020, 74.
- BUCEK, P.- ZOTTL, K.- KYNTÄJÄ, J.- MIGLIOR, F.- LECLERC, H.- VAN DER WESTHUIZEN, J.- KUWAN, K.- LAVON, Y.- HAASE, K.- TREJO, C.- RADZIO, D.- ELSAID OUDAH, Z. M.: World-Wide trends in milk-recording in cattle. ICAR, Krakow, 2015.
- BUCHBERGER, J.- KIERMEIER, F.: Über die Eignung von Natriumazid zur Konservierung von Milchproben. *Deutsche Molkerei-Zeitung* (Kempten Allgäu), F 8, 1975, 192-194.
- COLEMAN, D. A.- MOSS, B. R.: Effects of several factors on quantification of fat, protein, and somatic cells in milk. *J. Dairy Sci.*, 72, 1989, 3295-3303.
- COVENEY, L.: Milk testing proficiency scheme, Round 26 – November 2001. Example laboratory, Savant Technologies, 2001, 12.
- ČMSCH: Souborné zásady KU 2014. Interní, veřejně dostupný materiál, Českomoravská společnost chovatelů, a.s., Hradištko, 2013, 19. <http://www.cmsch.cz/ke-stazeni/?&print=1/>
- ČSN 57 0530: Methods for testing of milk and milk products. (In Czech) 1972: ČNI Praha.
- ČSN 57 0536: Determination of milk composition by mid-infrared analyzer. (In Czech) 1999: ČNI Praha.
- ČSN EN ISO/IEC 17025 (2005). Posuzování shody - Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří. Český normalizační institut, 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.
- ČSN EN ISO 13366-1 (57 0531): Mléko - Stanovení počtu somatických buněk – Část 1: Mikroskopická metoda. Český normalizační institut. Červenec 1998.
- ČSN EN ISO 13366-2 (57 0531): Mléko - Stanovení počtu somatických buněk – Část 2: Návod pro ovládání fluoro-opto-elektronického přístroje. Český normalizační institut. Červenec 2007.
- GRAPPIN, R. Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis - application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. Bulletin of the International Dairy Federation, Doc. 208, IDF Provisional Standard 128, 1987, 3-12.
- GRAPPIN, R. European network of dairy laboratories. V: Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories. Sonthofen / Germany, 1992-05-18/20, Brussels 1993, 205-211.
- HERING, P.- BUCEK, P.- HŘEBEN, F.- PYTLOUN, P.- PYTLOUN, J.- MATOUŠ, E.: 100 let kontroly mléčné užitkovosti skotu v Čechách, na Moravě a ve Slezsku. ISBN 80-239-5481-4. 2005, 105.
- KROGER, M.: Milk sample preservation. *J. Dairy Sci.*, 68, 1985, 783-787.
- KADEČKA, J.- ROZMAN, J.: Chov skotu v proměnách času v Čechách se zaměřením na severovýchodní Čechy. ChovServis a.s., Hradec Králové, 2006, 124.
- KUČERA, J.- LIPOVSKÝ, D.- TIŠNOVSKÁ, M.: Inovace v transportu vzorků mléka v kontrole užitkovosti. *Fenotyp DKU.CZ, Odborné informace, zprávy a zajímavosti pro chovatele*, 2,

- 2021, 30-31.
- KUČERA, J.: PP-prezentace: Kontrola užítkovosti. Českomoravská společnost chovatelů, a. s., 2020, 11. [www.uschovna.cz/en/zasilka/IESUHN94LA5BEV49-3Y2](http://www.uschovna.cz/en/zasilka/IESUHN94LA5BEV49-3Y2)
- KUPKA, K.: Statistické řízení jakosti. TriloByte. ISBN 80-238-1818-X, 1997, 119.
- KVAPILÍK, J.: Mastitidy u dojených krav a výrobní ztráty. Mastitis in dairy cows and production losses. *Veterinářství*, 64, 7, 2014 a, 550-560.
- KVAPILÍK, J.: Mastitidy dojených krav a ekonomické ztráty. Mastitis in dairy cows and economic losses. (In Czech) *Veterinářství*, 64, 12, 2014 b, 946-955.
- KVAPILÍK, J.- RŮŽIČKA, Z.: Odhad ztrát způsobených mastitidami. Estimation of losses by mastitis. (In Czech) *Veterinářství*, 2, 2009, 104-108.
- KVAPILÍK, J.- RŮŽIČKA, Z.- BUCEK, P. et al.: Chov skotu v České republice. Ročenka 2005. ČMSCH a.s. Praha, červen 2006, 104.
- KVAPILÍK, J.- SUCHÁNEK, B.: Vliv konzervace vzorků mléka na výsledky rozborů. *Živočišná Výroba*, 19, 1974, 1, 31-38.
- KVAPILÍK, J.- SYRŮČEK, J.: Somatic cell count and other milk quality indicators. (In Czech) *Mlékařské listy – zpravodaj*, 24, 137, 2013, 10-15.
- LACTANET: Milk sampling in Summer Temperatures, *Lactanet*, 2021.
- MICHALAK, W.- CYNALEWSKA, H.- OCZKOWICZ, H.: Collaborative testing among laboratories routinely testing fat and protein milk. *J. Dairy Sci.*, 61, 1978, 1634-1636.
- NG-KWAI-HANG, K. F.- HAYES, J. F.: Effects of potassium dichromate and sample storage time on fat and protein by Milko-Scan and on protein and casein by a modified Pro-Milk Mk II method. *J. Dairy Sci.*, 65, 1982, 1895-1899.
- PETTIPHER, G. L.- UBALDINA M. RODRIGUES: A bacteriostatic mixture for milk samples and its effect on bacteriological, cytological and chemical compositional analysis. *Journal of Applied Bacteriology*, 52, 1982, 259-265.
- RAPP, M.- MÜNCH, S.: Neuentwicklung von flüssigen Konservierungsmitteln für Milchproben. *Deutsche Molkerei-Zeitung*, 105, 1984, 1264-1272.
- SJAUNJA, L. O.: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. II. Factors affecting milk analyses by infrared technique under laboratory conditions. *Acta Agric. Scand.*, 34, 1984 a, 260-272.
- SJAUNJA, L. O.: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. III. The effect of different treatments on infrared analyses. *Acta Agric. Scand.*, 34, 1984 b: 273-285.
- SJAUNJA, L. O.- PHILIPSSON, J.- LUNDSTRÖM, K.- SWENSSON, CH.: Studies on milk analysis of individual cow milk samples. IV. Factors affecting milk analyses in a routine system by automated apparatuses. *Acta Agric. Scand.*, 34, 1984: 286-299.
- SUCHÁNEK, M.- PLZÁK, Z.- ŠUBRT, P.- KORUNA, I.: Kvalimetrie, 7. Validace analytických metod. Eurachem, 1999, 140.
- SZIJARTO, L. F.- HARDING, F.- HILL, A. R.- MELICHERCIK, J.: Cooling systems for transport of unpreserved milk samples. *J. Dairy Sci.*, 73, 1990, 2299-2308.
- VALENBERG VAN, H. J. F.: Standardization and control of instruments for analysis of milk. IDF Congress, Montreal, 1990, 1316-1321.
- VINES, D. T.- JENNY, B. F.- WRIGHT, R. E.- GRIMES, L. W.: Variation in milk fat, protein and somatic cell count from four dairy herd improvement laboratories. *J. Dairy Sci.*, 69, 1986: 2219-2223.
- VOORT VAN DE, F. R.- KERMASHA, S.- SMITH, J. P.- MILLS, B. L.- NG-KWAI-HANG, K. F.: A study of the stability of record of performance milk samples for infrared milk analysis. *J. Dairy Sci.*, 70, 1987: 1515-1523.
- WEAVER, J. C.- KROGER, M.- MCCARTHY, R.D.: Distribution of dichromate in preserved milk – toward utilization of spent milk samples from centralized testing laboratories. *J. Dairy Sci.*, 60, 1977, 706-709.

- ZAJÁC, P.- ČAPLA, J.- VIETORIS, V.- ZUBRICKÁ, S.- ČURLEJ, J.: Effect of storage on the major constituents of raw milk. *Potravinárstvo*, 9, 1, 2015, 375-381.
- ZAJÁC, P.- ZUBRICKÁ, S.- ČAPLA, J.- ZELENÁKOVÁ, L.- ŽIDEK, R.- ČURLEJ, J.: Effect of preservatives on milk composition determination. *International Dairy Journal*, 61, 2016, 239-244. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.06.008>

## VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

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

#### Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech:

- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- KOPECKÝ, J.: Nový konzervační prostředek vzorků mléka Broad spectrum microtabs v našich laboratořích. *Veterinářství*, 1993 a, 43, 12, 463-465.
- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Vliv ošetření vzorků mléka před měřením na odečet počtu somatických buněk přístrojem Fossomatic. Effect of milk sample treatment before measurement for reading of somatic cell number by the Fossomatic apparatus. *Živočišná Výroba*, 1993 b, 38, 6, 555-565.
- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- MATOUŠ, E.- GABRIEL, B.- KOPECKÝ, J.: Nahradí i v ČR bronopol dichroman draselný při konzervaci vzorků mléka? *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, ISSN 0139-7265, 1994, 4, 7-14.
- HANUŠ, O.- BENDA, P.- GENČUROVÁ, V.: Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofix pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. I. ověření bakteriostatických a baktericidních vlastností a interferenčního vlivu. Tests of Milkofix a new preservative substance for milk samples used for the purposes of an infrared analysis of basic milk composition. Part I. Checks of bacteriostatic and bactericidal abilities and interferential effect. *Veterinární Medicína*, 1992 a, 37, 1, ISSN 0375-8427, 21-31.
- HANUŠ, O.- BENDA, P.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Design a vyhodnocení prvního celostátního testu kvality rutinních analýz základního složení mléka. Design and evaluation of the first national qualitative testing of routine milk analyses. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, ISSN 1211-8516, 1998, XLVI, 3, 33-53.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- JEDELSKÁ, R.: Diagnostic use of proficiency testing in dairy laboratory. *Acta Agriculturae Slovenica*, 2004 a, 84, 1, 37-42.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ŽVÁČKOVÁ, I.: Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofix pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. II. ověření konzervačního účinku ve vztahu k infračervené analýze. Tests of Milkofix a new preservative substance for milk samples used for the purposes of an infrared analysis of basic milk composition. Part II. Checks of preservative effects in relation to the infrared analysis. *Veterinární Medicína*, 1992 b, 37, 1, ISSN 0375-8427, 33-43.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- GABRIEL, B.: Vliv stárnutí vzorků na přesnost infračervené analýzy základního složení mléka. The effect of sample aging on the accuracy of an infrared analysis of basic milk composition. *Veterinární Medicína*, 1992 c, 37, 3, ISSN 0375-8427, 149-160.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- GABRIEL, B.- ŽVÁČKOVÁ, I.: Srovnání účinnosti konzervačního přípravku Milkofix s tradičními konzervačními prostředky pro účely stanovení počtu somatických buněk ve vzorcích mléka fluoro-opto-elektronickou metodou. A comparison of the efficiency of Milkofix preservative substance with traditional preservatives used to determine somatic cell counts in milk samples by a fluoro-opto-electronic method. *Veterinární Medicína*, 1992 d, 37, 2, ISSN 0375-8427, 91-99.

- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- JEDELSKÁ, R.: Rámcové představení hlavních prvků systému QA u chemických a fyzikálních metod v referenčních a rutinních laboratořích pro analýzy kvality syrového mléka v ČR. A framework performance of main elements of QA system of chemical and physical methods in reference and routine laboratories for raw milk quality analyses in the CR. Sborník přednášek, 2 THETA Analytical standards and equipment, Zajištění kvality analytických výsledků, ISBN: 978-80-86380-37-7, Komorní Lhotka, 2007, 33-50.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ŘÍHA, J.- VYLETĚLOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Specifika referenčních materiálů a výkonnostního testování způsobilosti výsledků u základních mlékařských analýz. Specificity of reference materials and results proficiency testing in basic milk analyses. In proceedings: Referenční materiály a mezilaboratorní porovnávání zkoušek III. Reference materials and interlaboratory investigation comparison III. Mezinárodní konference, 2 THETA Analytical standards and equipment, Medlov, ISBN: 978-80-86380-46-9, 2008 a, 53-78.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ŠTOLC, L.- HULOVÁ, I.- MOTYČKA, Z.- KLIMEŠ, M.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Zajištění kvality stanovení minoritních metabolicko-diagnostických složek mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT). Quality assurance of investigation of minority metabolic diagnostic milk components via method of infrared spectroscopy (MIR and MIR-FT). Sborník přednášek, 2 THETA Analytical standards and equipment, Zajištění kvality analytických výsledků, ISBN: 978-80-86380-49-0, Komorní Lhotka, 2009, 211-237.
- HANUŠ, O.- HERING, P.- GENČUROVÁ, V.- MOTYČKA, Z.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Validation of deep freezing of pilot samples for checking of time stability of indirect analyses of basic milk composition and for their long shelf-life. Validace hlubokého zamrazování pilotních vzorků pro kontrolu stability výsledků nepřímých analýz základního složení mléka a pro jejich dlouhodobou údržnost. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, ISSN 1211-8516, LVI, 5, 2008 b, 57-68.
- HANUŠ, O.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- GENČUROVÁ, V.- BJELKA, M.- JEDELSKÁ, R.: Podmínky transportu a ošetření rutinních vzorků mléka jako důležitý faktor kvality výsledků analýz. The transport and treatment conditions of the routine milk samples as an important factor of the analytical result quality. *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, 2004 b, 1, 20-28.
- HANUŠ, O.- KLIMEŠ, M.- MIHULA, P.- KOZÁKOVÁ, A.- JEDELSKÁ, R.: Vliv odběru vzorku a základního ošetření mléka na bod mrznutí mléka a další ukazatele jeho složení. Impacts of the sampling of milk and the basic milk treatment on its freezing point and other compositional parameters. *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, ISSN 0139-7265, 2003, 4, 10-17.
- HANUŠ, O.- ŽVÁČKOVÁ, I.: Přeprava vzorků mléka v kontrole užitkovosti. *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, ISSN 0139-7265, 1989, 1, 19-21.
- HERING, P.- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- KLÍMOVÁ, Z.- SOJKOVÁ, K.- JEDELSKÁ, R.: Test věrohodnosti stanovení počtu somatických buněk ze vzorků mléka pro kontrolu užitkovosti. Reliability test of somatic cell count determination in the samples for milk recording. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, L, 184, 4, 2008 a, ISSN 0139-7265, 28-37.
- HERING, P.- GENČUROVÁ, V.- MOTYČKA, Z.- HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Kontrola časové stability přístrojů hluboce mraženými mléčnými standardy. Control of time instrument stability via deep frozen milk samples. *Náš Chov*, ISSN 0027-8068, 10, 2008 b, 80-82.
- KLIMEŠOVÁ, M.- NEJESCHLEBOVÁ, H.- VORLOVÁ, L.- HANUŠ, O.- HARUŠTIAKOVÁ, D.- NEJESCHLEBOVÁ, L.- VONDRUŠKOVÁ, E.- KOPECKÝ, J.: Srovnání celkového počtu vybraných skupin mikroorganismů v syrovém mléce při odběru na farmě a po transportu



do laboratoře. Comparison of the total number of selected groups of microorganisms in raw milk during collection on the farm and after transport to the laboratory. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 32, 188, 5, ISSN 1212-950X, 2021, 6-10.

- 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. Mastitidy dojených krav a finanční ztráty: ekonomická metaanalýza a modelová kalkulace. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21, 5, 2015 a, ISSN 1310-0351, 1092-1105.
- KVAPILÍK, J.- HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- FILIP, V.: Economic metaanalysis of impact of once a day milking. Ekonomická metaanalýza vlivu jednoho dojení denně. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21, 2, 2015 b, ISSN 1310-0351, 419-428.
- KVAPILÍK, J.- HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- ŘÍHA, J.- URBAN, P.- JEDELSKÁ, R.- SEYDLOVÁ, R.- KLIMEŠOVÁ, M.- KOPUNECZ, P.: Somatic cells in bulk samples and purchase prices of cow milk. Somatické buňky v bazénových vzorcích a nákupní ceny kravského mléka. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 65, 3, ISSN 1211-8516, 2017 a, 879-892.
- KVAPILÍK, J.- JEDELSKÁ, R.- HANUŠ, O.- URBAN, P.- ŘÍHA, J.- KOPUNECZ, P.- SEYDLOVÁ, R.- ROUBAL, P.- ZLATNÍČEK, J.- KLIMEŠ, M.: Somatické buňky v mléce individuálních krav a vybrané ukazatele. Somatic cell count in milk from individual dairy cows and selected indicators. (In Czech) *Mlékařské listy - zpravodaj*, 27, 158, 5, ISSN 1212-950X, 2016, 5-12.
- KVAPILÍK, J.- KUČERA, J.- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- SEYDLOVÁ, R.- URBAN, P.- KOPUNECZ, P.- JEDELSKÁ, R.: Zdravotní stav mléčné žlázy, jakost a nákupní ceny mléka. Udder health state, milk quality and purchase prices. (In Czech) *Náš chov*, LXXVII, 5, ISSN 0027-8068, 2017 b, 25-28.
- SOJKOVÁ, K.- HANUŠ, O.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Stanovení teplotního gradientu mezilaboratorního transportu vzorků mléka. Determination of thermogradient for interlaboratory milk sample transport. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 187, 3, ISSN 0139-7265, 2009, 35-41.

### **Předchozí tématicky relevantní certifikované metodiky k problematice provedení ošetření vzorků mléka v kontrole mléčné užitkovosti:**

- UPLATNĚNÁ METODIKA QF 3019 UM 1 - Adjustační principy a postupy – centrální adjustace rutinních měření chemických složek v mléčných laboratořích. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci uplatněné metodiky mezi Výzkumným ústavem pro chov skotu, s.r.o., Rapotín a ČMSCH a.s., Praha, z 12. 12. 2006 a. HANUŠ, O.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.
- UPLATNĚNÁ METODIKA QF 3019 UM 2 - Principy a postupy výkonnostního testování analytické způsobilosti měření chemického složení v mléčných laboratořích. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci uplatněné metodiky mezi Výzkumným ústavem pro chov skotu, s.r.o., Rapotín a ČMSCH a.s., Praha, z 12. 12. 2006 b. HANUŠ, O.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.
- UPLATNĚNÁ METODIKA MSM 2678846201 UM 4 - Postup hlubokého zamrazování pilotních vzorků pro kontrolu stability výsledků analýz složení mléka a jejich dlouhou expiraci. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci uplatněné metodiky mezi Agrovýzkumem Rapotín s.r.o. a ČMSCH a.s., Praha, z 11. 4. 2008 c. HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.- HERING, P.- MOTYČKA, Z.
- CERTIFIKOVANÁ METODIKA RO1419 CM 38 – Postup přípravy standardních vzorků pro hluboké zmrazení a aplikaci ve výkonnostním testování analytické způsobilosti při určení složení mléka nepřímými metodami. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha a Bentley Czech s.r.o. z 5. 11. 2019. Datum certifikace 1. 11. 2019 (č. 8499/2019 - ČPI). ISBN:

978-80-904348-8-2 HANUŠ, O.- KLIMEŠOVÁ, M.- CHLÁDEK, G.- ROUBAL, P.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J. [http://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/cm38\\_2019.pdf](http://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/cm38_2019.pdf)

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

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

### **Přílohy, dokumenty a doklady:**

technická řešení a postupy této certifikované metodiky byly zejména podpořeny výsledky vlastního výzkumu, vývoje a empirických poznatků, které byly publikovány.

Datum: 31. 1. 2022

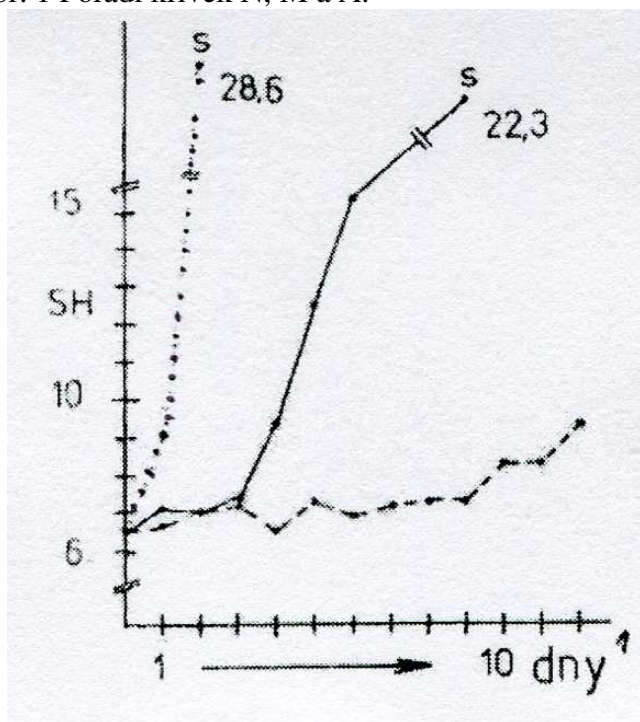
**Za zhotovitele:**

prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.



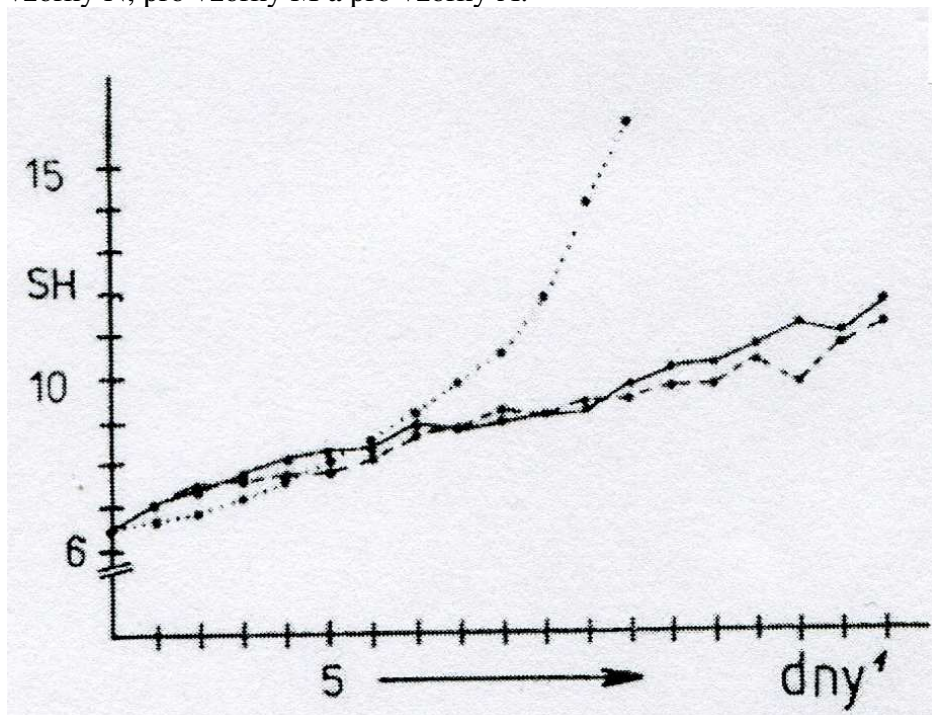
## 7) Přílohové materiály s podklady pro retrospektivní analýzu v rámci certifikované metodiky

Obr. 1 Pořadí křivek N, M a A.

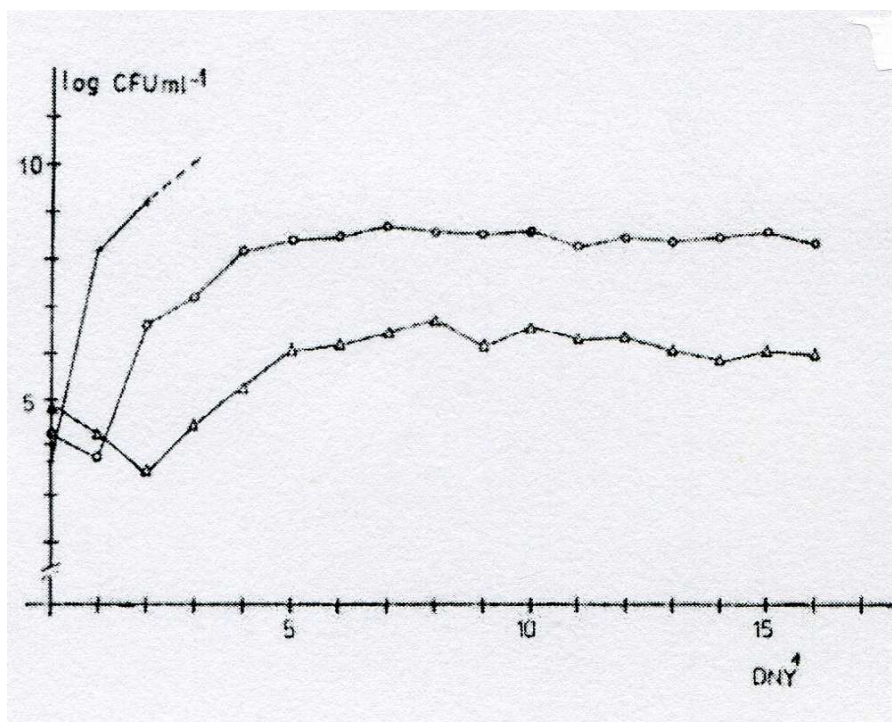


Dynamika hodnot SH (2,5 mmol.l<sup>-1</sup>) v čase uložení vzorků mléka při teplotě 20 °C pro vzorky N, pro vzorky M a pro vzorky A.

Obr. 2 Dynamika hodnot SH (2,5 mmol.l<sup>-1</sup>) v čase uložení vzorků mléka při teplotě 4 °C pro vzorky N, pro vzorky M a pro vzorky A.



Obr. 3 Růstové křivky celkového počtu mikroorganismů v čase uložení při teplotě 20 °C pro vzorky mléka N (+), M (o) a konzervované dvojjchromanem draselným ( $\Delta$ ).



Tab. 1 Srovnání testů mezi kontrolními vzorky a kontrolními vzorky s přidáním konzervovadly (upraveno podle Multispec, Blandford Systems Ltd, měřeno na přístrojích Milko-Scan 203 Foss Electric); vyjádřeno průměrnými diferencemi od kontrolních vzorků.

Konzervační činidlo <sup>1</sup>	Tuk <sup>2</sup> (%)		Bílkoviny <sup>3</sup> (%)	Laktóza <sup>4</sup> (%)
	A filtr <sup>5</sup>	B filtr <sup>6</sup>		
Labs Preservo, (Bronopol), prášková směs 10/25/82 <sup>7</sup>	-0,003	-0,001	+0,004	+0,001
Labs Preservo, (Bronopol), prášková směs 12/8/82 <sup>8</sup>	-0,015	-0,0005	-0,002	0
Labs Preservo, (Bronopol), tablety <sup>9</sup>	0	-0,004	-0,005	+0,001
Bronopol, čistý prášek <sup>10</sup>	+0,003	+0,001	+0,010	+0,011
Boots Bronotab	-0,029	-0,079	+0,038	+0,001
Nasco, dvojjchroman draselný tablety <sup>11</sup>	-0,021	-0,060	-0,037	-0,020
Nasco, kyselina boritá, tablety <sup>12</sup>	+0,001	-0,005	-0,753	+0,336
German Milk Marketing Board, azid sodný, tablety <sup>13</sup>	-0,028	-0,074	-0,014	+0,008

Tab. 2 Vyjádření dob uložení vzorků mléka (ve dnech) při různých způsobech ošetření, které jsou přijatelné k získání použitelných výsledků při infraanalýze základních složek mléka. Doby celkové jsou odhadnuty po zvážení významnosti dob pro jednotlivé složky.

Složka <sup>1</sup> Teplota <sup>2</sup> Ošetření <sup>3</sup>	Tuk <sup>4</sup>		Bílkoviny <sup>5</sup>		Laktóza <sup>6</sup>		Celkem <sup>7</sup>	
	I	II	I	II	I	II	I	II
N	0	10	1	11	0	9	0	10
A	9	4	13	8	12	11	9	5
B	13	11	13	11	9	17	10	11
C	13	15	13	17	13	17	13	15
M	6	10	4	10	4	17	4	10

I = 20 °C; II = 4 °C; N – nekonzervované, A – azid sodný; B – bronopol; C – dvojjchroman draselný; M – Milkofix (platí pro tab. 2 – 5)

Tab. 6 Výsledky stanovení tuku, bílkovin a laktózy při 20 °C přístrojem Milko-Scan 133B u různě konzervovaných bazénových vzorků mléka. Hodnoty udávají průměry šesti vzorků.

Složka	Konzervace	Dny po odběru						
		0	1	2	4	7	8	11
T	N	4,35 <sup>a</sup>	4,29	s				
	Br	4,27 <sup>a</sup>	4,18	4,14	4,14	4,18	4,25 <sup>a</sup>	4,42 <sup>a</sup>
	D	4,34 <sup>a</sup>	4,22	4,18	4,18	4,27	4,33 <sup>a</sup>	4,27 <sup>a</sup>
	BSMT	4,34 <sup>a</sup>	4,24	4,21	4,24	4,31 <sup>a</sup>	4,34 <sup>a</sup>	4,34 <sup>a</sup>
B	N	3,44	3,47	s				
	Br	3,40	3,42	3,38	3,40	3,46	3,46	3,48 <sup>a</sup>
	D	3,44	3,40	3,36	3,39	3,44	3,44	3,43
	BSMT	3,45	3,42	3,38	3,42	3,47	3,46	3,41
L	N	4,79 <sup>a</sup>	4,73	s				
	Br	4,81	4,82	4,83	4,82	4,80	4,79	4,79
	D	4,76	4,79	4,79	4,79	4,79	4,79	4,81
	BSMT	4,83	4,85	4,84	4,81	4,81	4,81	4,81

T = tuk, B = bílkoviny, L = laktóza, N = nekonzervované, Br = tablety Betuna, D = dvojjchroman draselný, BSMT = mikrotablety D & F Control Systems  
s = sražený vzorek, a = diference od referenční hodnoty (1. den měření) > ± 0,05 %

Tab. 3 Výsledky obsahu tuku tří bazénových vzorků mléka různě ošetřených a měřených na přístroji MSc 133B v jednotlivých dnech. Hodnoty představují aritmetické průměry tří vzorků (%).

Teplota <sup>1</sup> Konzervace <sup>2</sup> Den <sup>3</sup>	I					II				
	N	A	B	C	M	N	A	B	C	M
1	4,43	4,39	4,40	4,41	4,33	4,45	4,39	4,41	4,41	4,34
2	a 4,26	4,38	4,39	4,39	4,32	4,46	4,40	4,41	4,40	4,35
3	s	a 4,31	4,36	4,37	4,30	4,45	4,41	4,41	4,38	4,34
4		4,34	4,37	4,37	4,31	4,48	a 4,46	4,43	4,39	4,38
5		4,36	4,42	4,42	4,36	a 4,51	a 4,47	4,45	4,42	a 4,41
6		4,35	4,40	4,40	4,33	4,48	ab 4,49	a 4,47	4,41	4,39
7		4,37	4,41	4,37	4,40	4,49	a 4,52	a 4,47	4,39	4,39
8		4,35	4,41	4,41	4,46	4,48	a 4,49	a 4,43	4,40	a 4,39
9		4,38	4,42	4,39	4,42	a 4,51	ab 4,56	a 4,49	4,42	4,42
10		4,36	4,40	4,36	4,48	a 4,48	a 4,53	4,45	4,37	a 4,39
11		4,35	4,38	4,39	4,56	b 4,50	a 4,49	4,46	b 4,36	a 4,40
12		4,36	4,42	4,38	s	a 4,51	ab 4,49	b 4,46	a 4,38	a 4,42
13		4,36	4,42	4,38		ab 4,52	ab 4,54	a 4,47	a 4,37	a 4,42
14		4,37	4,44	4,36		a 4,51	a 4,57	a 4,50	a 4,38	a 4,42
15							a 4,50	a 4,53	a 4,38	a 4,40
16							a 4,54	a 4,50	a 4,36	a 4,40
17							ab 4,52		a 4,29	a 4,36
18							a 4,47	a 4,44	a 4,32	a 4,37

a = diference  $> \pm 0,05$  od hodnoty referenční (první řádek); b = statisticky významná diference  $P < 0,01$  od referenční hodnoty; s = sražené vzorky (platí pro tabulky 3 – 5)

Tab. 4 Výsledky obsahu laktózy tří bazénových vzorků mléka různě ošetřených a měřených na přístroji MSc 133B v jednotlivých dnech. Hodnoty představují aritmetické průměry tří vzorků (%).

Teplota <sup>1</sup> Konzervace <sup>2</sup> Den <sup>3</sup>	I					II				
	N	A	B	C	M	N	A	B	C	M
1	4,96	4,94	4,96	4,90	5,05	4,95	4,94	4,94	4,91	5,05
2	a 4,56	4,95	4,97	4,95	5,07	4,96	4,95	4,97	4,94	5,07
3	s	4,99	4,97	4,97	5,07	4,97	4,96	4,98	b 4,95	5,09
4		4,96	4,94	4,95	5,02	4,94	4,92	4,96	4,93	5,06
5		4,95	4,93	4,94	4,96	4,92	4,91	4,94	4,92	5,03
6		4,96	4,93	4,95	4,90	4,93	4,91	4,94	4,94	5,05
7		4,95	4,92	4,95	4,79	4,91	4,90	4,93	4,93	5,05
8		4,94	4,92	4,95	4,73	4,91	4,90	4,94	4,93	5,04
9		4,93	4,91	4,94	4,63	a 4,88	a 4,88	4,92	4,92	5,02
10		4,91	4,91	4,95	4,50	a 4,87	b 4,89	4,92	4,93	5,03
11		4,91	4,87	4,94	4,42	a 4,85	4,89	4,92	4,92	5,03
12		4,90	4,90	4,96	s	a 4,85	ab 4,91	ab 4,93	4,94	5,02
13		4,88	4,89	4,95		ab 4,81	ab 4,86	4,92	4,94	5,03
14		4,85	4,85	4,95		4,79	4,86	4,90	4,92	5,02
15							4,90	4,90	4,92	5,02
16							a 4,87	4,90	4,93	5,01
17							b 4,90	4,95	b 4,96	5,05
18							4,89	4,93	4,95	5,04

Tab. 5 Výsledky obsahu bílkovin tří bazénových vzorků mléka různě ošetřených a měřených na přístroji MSc 133B v jednotlivých dnech. Hodnoty představují aritmetické průměry tří vzorků (%).

Teplota <sup>1</sup> Konzervace <sup>2</sup> Den <sup>3</sup>	I					II				
	N	A	B	C	M	N	A	B	C	M
1	3,51	3,50	3,51	3,49	3,52	3,52	3,51	3,52	3,49	3,51
2	a 3,46	3,51	3,55	3,53	3,54	b 3,55	3,54	3,55	3,52	b 3,65
3	s	3,53	3,53	3,51	3,54	3,55	3,55	3,55	3,52	3,55
4		3,52	3,53	3,51	3,55	3,54	3,55	3,54	3,52	3,55
5		3,51	3,53	3,50	3,60	3,54	3,56	3,54	3,50	3,55
6		3,50	3,51	3,49	3,64	3,54	3,56	3,54	3,49	3,53
7		3,51	3,52	3,49	3,68	3,54	3,57	3,55	3,50	3,55
8		3,50	3,51	3,49	3,68	3,58	3,57	3,54	3,51	3,55
9		3,50	3,52	3,49	3,74	3,54	3,57	3,54	3,49	3,55
10		3,52	3,53	3,50	3,75	3,56	3,60	3,57	3,52	3,56
11		3,53	3,56	3,51	3,72	a 3,58	a 3,59	a 3,57	3,52	a 3,58
12		3,53	3,55	3,50	s	a 3,58	ab 3,61	a 3,58	3,52	a 3,59
13		3,53	3,54	3,50		a 3,59	ab 3,62	a 3,59	3,52	ab 3,59
14		3,54	3,54	3,51		ab 3,59	ab 3,63	a 3,60	3,51	a 3,59
15						a 3,59	a 3,58	a 3,48	3,55	
16						a 3,60	a 3,56	a 3,49	3,55	a
17						a 3,68	a 3,60	a 3,52	3,60	a
18						a 3,65	a 3,60	a 3,50	3,60	a



Tab. 7 Výsledky stanovení tuku, bílkovin a laktózy při 4 °C přístrojem Milko-Scan 133B různě konzervovaných bazénových vzorků mléka. Hodnoty udávají průměry šesti vzorků.

Složka	Konzervace	Dny po odběru										
		0	1	2	4	7	9	11	14	16	18	
T	N	4,33 <sup>a</sup>	4,25	4,21	4,28 <sup>a</sup>	4,43 <sup>a</sup>	4,48 <sup>a</sup>					
	Br	4,25 <sup>a</sup>	4,18	4,15	4,21	4,23	4,32 <sup>a</sup>	4,32 <sup>a</sup>	4,26 <sup>a</sup>	4,25 <sup>a</sup>	4,24 <sup>a</sup>	
	D	4,18	4,22	4,20	4,23	4,26	4,27	4,33 <sup>a</sup>	4,28 <sup>a</sup>	4,27	4,25	
	BSMT	4,29 <sup>a</sup>	4,22	4,21	4,26	4,27	4,35 <sup>a</sup>	4,22	4,30 <sup>a</sup>	4,31 <sup>a</sup>	4,29 <sup>a</sup>	
B	N	3,44	3,41	3,38	3,43	3,49 <sup>a</sup>	3,46					
	Br	3,43	3,41	3,38	3,44	3,46	3,52 <sup>a</sup>	3,51 <sup>a</sup>	3,47 <sup>a</sup>	3,47 <sup>a</sup>	3,49 <sup>a</sup>	
	D	3,40	3,38	3,34	3,38	3,42	3,42	3,42	3,40	3,38	3,39	
	BSMT	3,41	3,40	3,37	3,43	3,44	3,50 <sup>a</sup>	3,49 <sup>a</sup>	3,48 <sup>a</sup>	3,46 <sup>a</sup>	3,47 <sup>a</sup>	
L	N	4,87	4,86	4,84	4,79	4,75 <sup>a</sup>	4,66 <sup>a</sup>					
	Br	4,87	4,87	4,86	4,83	4,82	4,80 <sup>a</sup>	4,81 <sup>a</sup>	4,78 <sup>a</sup>	4,80 <sup>a</sup>	4,80 <sup>a</sup>	
	D	4,83	4,82	4,81	4,78	4,78	4,78	4,79	4,77	4,79	4,79	
	BSMT	4,92	4,92	4,88	4,88	4,88	4,82 <sup>a</sup>	4,82 <sup>a</sup>	4,79 <sup>a</sup>	4,80 <sup>a</sup>	4,79 <sup>a</sup>	

Tab. 8 Výsledky počtu somatických buněk (tis.ml<sup>-1</sup>) v mléce s přidavkem různých konzervačních směsí měřených 0. – 9. (resp. 18.) den. První měření bylo provedeno cca 6 hod. po odběru vzorků.

Teplota	20 °C				4 °C				
	Konzervace	N	Br	D	BSMT	N	Br	D	BSMT
Den									
0		<b>144</b>	<b>162</b>	<b>171</b>	<b>186</b>	180	210	198	212
1		s	178	201	192	<b>197</b>	<b>208</b>	<b>208</b>	<b>210</b>
2			196	209 <sup>a</sup>	206	234 <sup>a</sup>	221	234	229
4			136	156	151	217	219	226	225
7			138	85 <sup>a</sup>	138	s	231	242 <sup>a</sup>	238
9			115 <sup>a</sup>	46 <sup>a</sup>	118 <sup>a</sup>		227	238	227
11							194	217	211
14							199	211	205
16							198	210	202
18							197	212	202

a = diference > ± 30 tis. ml<sup>-1</sup> od referenční hodnoty (tučně vytištěna)

Tab 9 Vliv různých konzervačních prostředků při běžně používaných koncentracích na stanovení počtu somatických buněk (SB) v mléce (tis.ml<sup>-1</sup>) metodou Fossomatic. Měření bylo uskutečněno 8 h po odběru vzorků od individuálních krav a uložených po rozpuštění konzervačních prostředků při teplotě 4 °C.

Konzervace <sup>1</sup> Rozsah počtu SB <sup>2</sup>	n	N	A	B	C	M	Diference v % N <sup>3</sup>			
							N-A	N-B	N-C	N-M
< 250	11	153	146	156	156	150	4,7	- 2,1	- 1,9	2,0
250 – 500	5	347	420	488	486	472	-21,0	-40,5	-39,9	-36,0
> 500	4	1728	2136	2222	2228	2209	-23,7	-28,7	-29,0	-28,0
Celkem <sup>4</sup>	20	517	613	652	653	642	-18,6*	-26,3*	-26,4*	-24,3*

N – nekonzervované, A = azid sodný; B = bronopol; C = dvojjchroman draselný; M = Milkofix (platí pro tabulky 9 – 12)

Tab. 11 Výsledky počtu somatických buněk bazénových vzorků mléka (tis. ml<sup>-1</sup> různě ošetřených a měřených na přístroji Fossomatic 90 v jednotlivých dnech. Hodnoty představují aritmetické průměry šesti vzorků.

Teplota <sup>1</sup> Konzervace <sup>2</sup> Den <sup>3</sup>	I					II				
	N	A	B	C	M	N	A	B	C	M
1	ab									
2	370	376	379	375	380	370	376	379	375	380
3	422	363	395	380	388	378	361	384	377	375
5		a			a					
7	s	337	401	384	359	385	355	381	371	380
9		ac	b		a					
11		290	374	369	320	358	351	393	379	381
13		ac			a	a				
15		271	380	384	335	342	352	391	383	381
17		ac	ac	ab	s	360	352	381	366	363
		ac	ab	ac		a	ac			
		194	287	326		424	333	373	369	368
						a				c
						464	359	388	388	359
						ab				
						503	359	385	372	370
						s	340	377	371	376

Teploty uložení vzorků: I = 20 °C; II = 4 °C; a = diference > ± 24 od referenční hodnoty (2. den měření); b = statisticky významná diference od referenční hodnoty (párový t-test) P < 0,05; c = statisticky významná diference od referenční hodnoty P < 0,01; s = sražený vzorek.

Tab. 10 Vliv různých konzervačních prostředků na stanovení počtu somatických buněk (SB) v mléce (tis.ml<sup>-1</sup>) metodou Fossomatic. Měření bylo uskutečněno v bazénových vzorcích mléka nekonzervovaných 6 h po odběru při teplotě uložení 4 °C (1) a pak v týchž vzorcích nekonzervovaných po 24 h při teplotě 20 °C (2) a nekonzervovaných a konzervovaných po 24 h při teplotě 4 °C (3).

Teplota a čas uložení <sup>1</sup>	n	1	2	3	3	3	3	3	Diference v % N1 <sup>4</sup>						Diference v % N3 <sup>5</sup>				
Konzervace <sup>2</sup>		N	N	N	A	B	C	M	N1-N2	N1-N3	N1-A	N1-B	N1-C	N1-M	N3-N2	N3-A	N3-B	N3-C	N3-M
Rozsah počtu SB <sup>3</sup>																			
< 250	14	158	208	188	180	191	192	192	-31,7	-19,6	-13,9	-20,9	-21,5	-21,5	-10,6	4,3	-1,6	-1,6	-1,6
250 – 500	4	334	387	355	334	356	354	352	-15,9	- 6,3	0	- 6,7	- 6,0	- 5,7	- 9,0	5,9	-0,3	0,4	0,8
> 500	2	556	588	553	544	583	578	576	- 5,8	0,7	2,2	- 4,8	- 3,9	- 3,6	- 6,3	1,5	-5,4	-4,5	-4,3
Celkem <sup>6</sup>	20	233	282	258	247	263	263	262	**	**	*	**	**	**	**	**			
									-21,0	-10,7	- 6,0	-12,9	-12,9	-12,9	-9,3	4,3	-1,9	-1,9	-1,6

\* — P < 0,05; \*\* — P < 0,01

Tab. 12 Seřazení podle vhodnosti použití jednotlivých způsobů ošetření vzorků mléka (tj. konzervace a teploty uložení) uvnitř jednotlivých kritérií ( $\alpha$  až  $\delta$ ) a celkem pro určení počtu somatických buněk metodou Fossomatic.

Teplota <sup>1</sup> Konzervace <sup>2</sup> Kritérium <sup>3</sup>	I					II				
	N	A	B	C	M	N	A	B	C	M
$\alpha$	6	4	3	3	5	3	2	1	1	1
$\beta$	7	5	4	3	6	1	2	1	1	1
$\gamma$	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1
$\delta$	10	9	8	5	7	6	4	2	1	3
Celkem <sup>4</sup>	10	8	7	6	9	5	4	2	1	3

Teploty uložení vzorků: I = 20 °C; II = 4 °C;  $\alpha$  = % difference >  $\pm 24$  od referenční hodnoty (v tab. 11 = a);  $\beta$  = % statisticky významných diferencí od referenční hodnoty (v tab. 11 = b, c);  $\gamma$  = seřazeno podle počtu dní do sražení vzorků;  $\delta$  = seřazení od nejnižší do nejvyšší variability v tab. 11 ( $\bar{x} \pm s_x$ ); kritéria  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  – vše hodnoceno do 11. dne uložení.

Tab. 13 Korelační koeficienty mezi změnami v obsahu složek stárnoucích vzorků mléka odděleně pro jednotlivé způsoby ošetření.

Ošetření – konzervace a teplota <sup>1</sup>	Laktóza/tuk <sup>2</sup>	Laktóza/bílkoviny <sup>3</sup>
N II	-0,80	-0,83
A I	-0,38	-0,56
A II	-0,91	-0,59
B I	-0,61	-0,30
B II	-0,89	-0,41
C I	0,14	-0,04
C II	-0,61	-0,59
M I	-0,95	-0,94
M II	-0,86	-0,25

N – nekonzervované, A – azid sodný; B – bronopol; C – dvojjchroman draselný; M – Milkofix; I = 20 °C; II = 4 °C.

Tab. 14 Mikrobiologické vyšetření vzorků mléka (BENDA, 1995).

Seznam variant pokusu a konzervačních činidel.

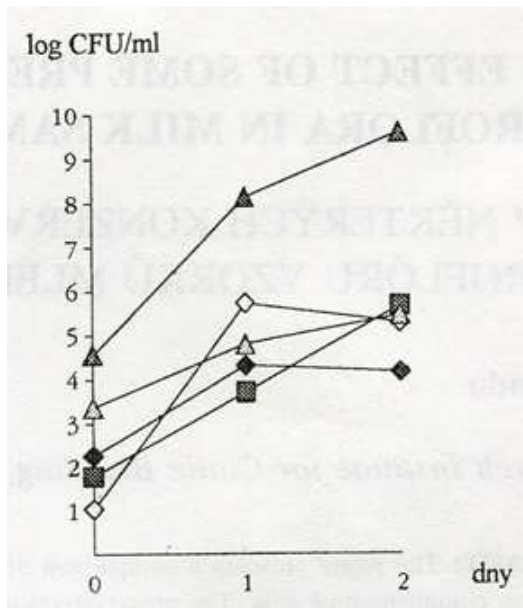
Skupina mikroorganismů Kultivační doba / teplota	Kultivační médium, výrobce
Mezofilní mikroorganismy 72 h / 30 °C	živý agar č. 2 Imuna, Šarišské Michaľany, obohacen glukózou do koncentrace 10 g/l před vylitím na misky, inokulum zaléváno
Koliformní bakterie 48 hod / 37 °C	Mc Conkey agar pro stanovení enterobaktérií, Imuna, inokulum zaléváno
Stafylokoky 72 hod / 37 °C	selektivní agar pro stanovení stafylokoků Mannitol Salt Phenol Red agar, složení podle Mercks č. 5404, inokulace na povrch půdy
Enterokoky 48 hod / 37 °C	selektivní agar pro stanovení enterokoků Slanetz-Barley, předpis Mercks č. 5262, inokulace na povrch půdy
Bakterie mléčného kvašení 120 hod / 30 °C	Rogosa SL agar pro stanovení bakterií mléčného kvašení, předpis Mercks č. 5413, inokulace na povrch půdy

Tab. 15 Ošetření vzorků mléka při 20 °C (BENDA, 1995).

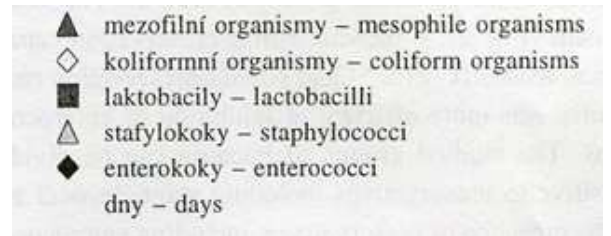
Sledované skupiny mikroorganismů a použitá kultivační média.

Označení varianty	Konzervační činidlo	Složení a koncentrace v 25 ml mléka
N	bez konzervačních činidel	nekonzervováno
A	azid sodný	konzervační směs 0,0085 g NaN <sub>3</sub> (Janssen Chimica) a 0,063 g NaCl, připravováno v laboratoři
B	Bronopol	konzervační směs 0,005 g 2-bromo-2-nitro-1,3 propandiolu a 0,050 g NaCl, tablety PSL Microtabs
C	dvojjchroman draselný	0,033 g K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> a 0,067 g KCl tablety Merck
M	Milkofix	složení neudáno, 0,125g práškové směsi (Tržický)

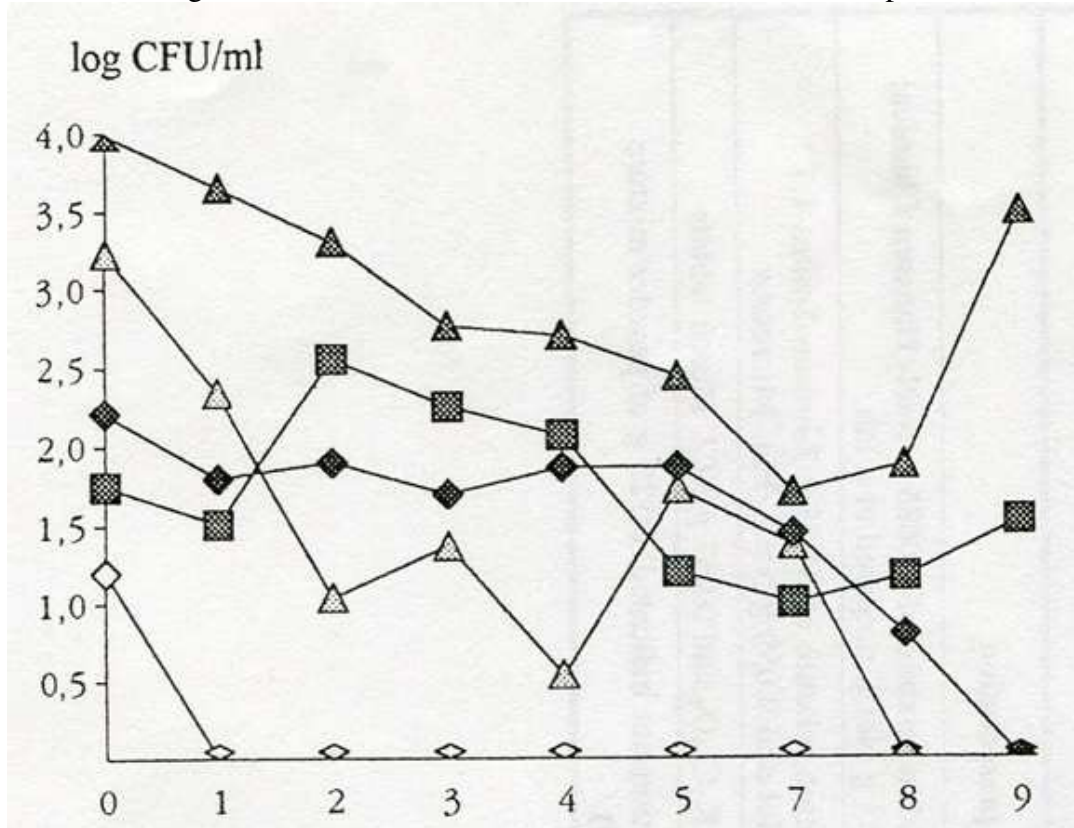
Obr. 4 Růstové křivky mléčných mikroorganismů - nekonzervované (BENDA, 1995).  
Růst mikroorganismů ve vzorcích mléka bez konzervačních prostředků



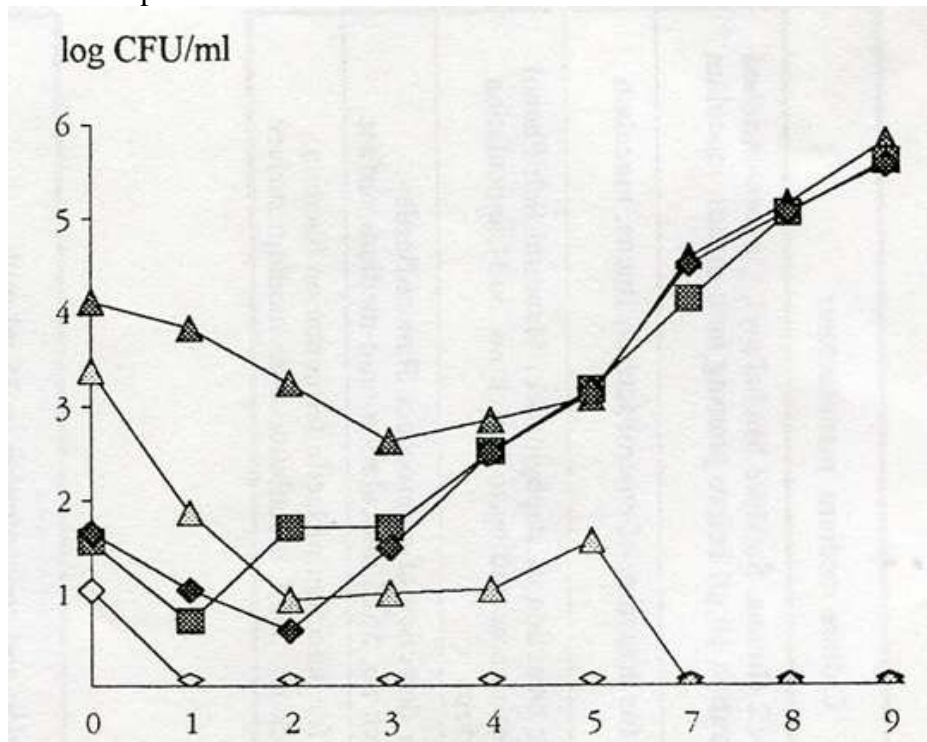
Legenda k obr. 4 – 8



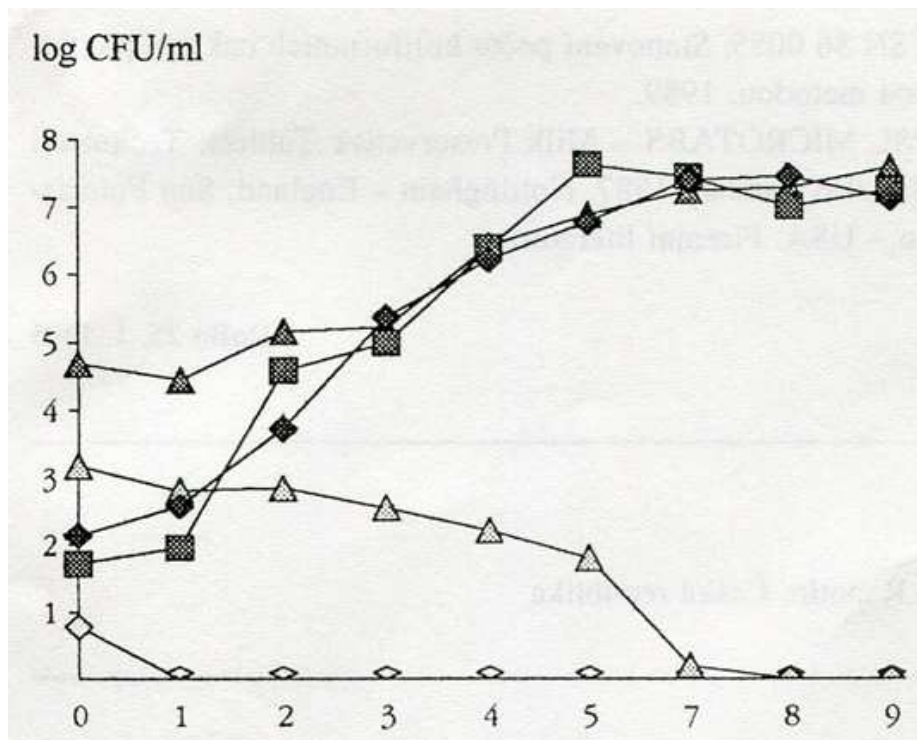
Obr. 5 Růstové křivky mléčných mikroorganismů - Bronopol (BENDA, 1995).  
Růst mikroorganismů ve vzorcích mléka s obsahem konzervačního prostředku Bronopol



Obr. 6 Růstové křivky mléčných mikroorganismů – Dvojchroman draselný (BENDA, 1995).  
Růst mikroorganismů ve vzorcích mléka s obsahem dvojchromanu draselného jako konzervačního prostředku

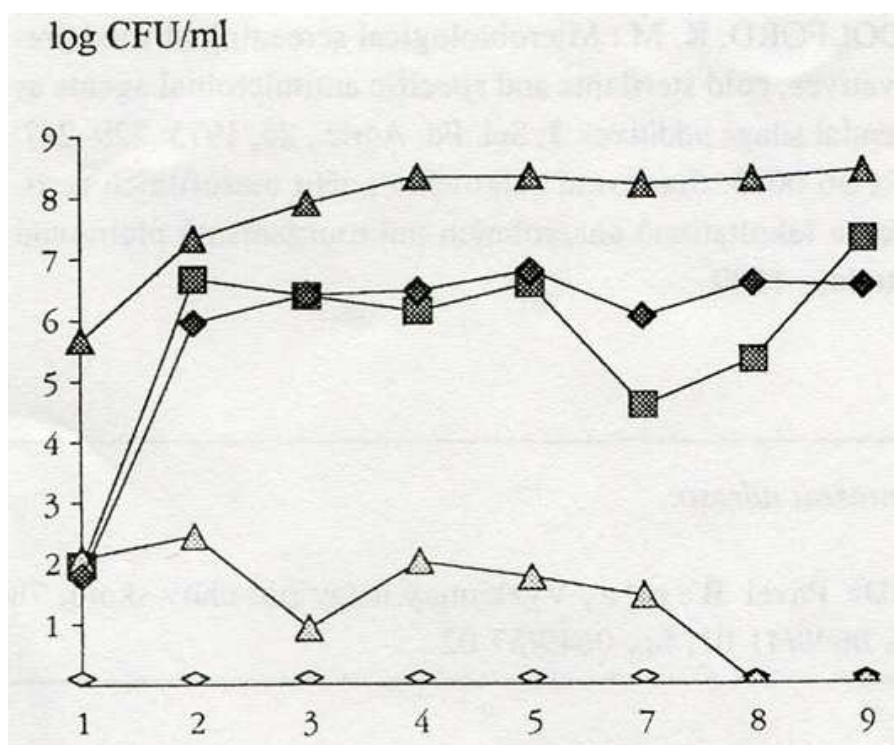


Obr. 7 Růstové křivky mléčných mikroorganismů – Azid sodný (BENDA, 1995).  
Růst mikroorganismů ve vzorcích mléka s obsahem azidu sodného jako konzervačního prostředku



Obr. 8 Růstové křivky mléčných mikroorganismů - Milkofix (BENDA, 1995).

Růst mikroorganismů ve vzorcích mléka s obsahem konzervačního prostředku Milkofix



Tab. 16 Charakterizace chovů (KLIMEŠOVÁ et al., 2021).

Odměrné místo	plemeno	Počet dojených krav	Dojírna	Čas analýzy na farmě	Teplota mléka (°C)
1	H	89	4+4	6:35 – 6:40	6,6 – 7,3
2	C/H	24	stání	7:15 – 7:30	8,3 – 10,3
3	H	39	4	7:40 – 8:15	8,3 – 12,4
4	H	330	6+6	9:00 – 9:30	5,6 – 8,2
5	MIX	45	robot	9:50 – 10:20	3,1 – 7,1
6	C	150	5+5	10:30 – 11:00	4,5 – 7,1
7	C	350	2 x 10	12:30	4,7 – 7,6

Vysvětlivky: H = Holštýn; C = České strakaté

Tab. 17 Schéma odběru vzorků (KLIMEŠOVÁ et al., 2021).

Sada 7 vzorků	Zpracování – farma nebo laboratoř	Teplota (°C)	Čas analýzy
1. sada (F)	farma	v tabulce 1	v tabulce 1
2. sada (LB)	laboratoř (přeprava chladicí box)	8,3 – 8,9	15:00 – 15:10
3. sada (BCH)	laboratoř (přeprava box bez chlazení)	25,5 – 30,7	15:00 – 15:10
4. sada (H)	laboratoř (přeprava box bez chlazení + konzervace)	25,5 – 30,7	15:00 – 15:10



Tab. 18 Průměrné hodnoty (KLIMEŠOVÁ et al., 2021) CPM, CPP a Koli u vzorků analyzovaných na farmě (F – 1. sada) a v laboratoři (LB – 2. sada).

Farma		CPM (KTJ·10 <sup>3</sup> /ml)		CPP (KTJ·10 <sup>3</sup> /ml)		Koli (KTJ·10 <sup>2</sup> /ml)	
		F	LB	F	LB	F	LB
1	x	3,1	4,4	0,5	0,4	1,4	1,2
	xg	3,0	3,8	0,4	0,4	0,6	0,6
2	x	14,0	11,6	5,6	5,1	1,1	1,2
	xg	10,3	8,8	4,6	4,1	0,5	0,6
3	x	5,7	6,8	0,1	0,1	0,4	0,4
	xg	5,3	6,3	0,1	0,1	0,3	0,3
4	x	12,5	17,2	1,4	1,5	0,3	0,2
	xg	8,7	10,3	0,9	1,0	0,2	0,2
5	x	28,8	45,6	9,0	8,0	7,1	8,0
	xg	21,3	33,4	8,1	7,2	6,0	6,5
6	x	7,6	7,3	1,0	0,8	0,5	0,5
	xg	4,8	4,7	0,6	0,4	0,2	0,2
7	x	15,6	17,1	2,0	1,9	0,4	0,4
	xg	14,9	16,0	1,9	1,8	0,4	0,4

F = sada 1, vzorky analyzované na farmě; LB = sada 2, vzorky analyzované v laboratoři; n = počet vzorků; x = aritmetický průměr; xg = geometrický průměr

Tab. 19 Průměrné hodnoty CPM, CPP a Koli (KLIMEŠOVÁ et al., 2021) u vzorků připravovaných v boxu bez chlazení (BCH – 3. sada) a vzorků s Heeschovým čidlem (H – 4. sada).

Farma		CPM (KTJ·10 <sup>3</sup> /ml)		CPP (KTJ·10 <sup>3</sup> /ml)		Koli (KTJ·10 <sup>2</sup> /ml)	
		BCH	H	BCH	H	BCH	H
1	x	16,4	3,1	7,7	0,7	6,5	1,3
	xg	12,8	3,0	6,0	0,6	3,1	0,6
2	x	29,2	10,0	22,7	5,8	65,7	0,7
	xg	78,8	8,0	17,9	4,5	21,3	0,4
3	x	92,7	6,7	59,2	0,7	27,6	0,4
	xg	46,9	6,3	18,8	0,2	17,8	0,3
4	x	68,3	11,3	4,2	1,2	29,0	0,4
	xg	44,8	8,2	3,9	0,8	24,3	0,3
5	x	234,7	27,0	161,5	24,0	94,7	6,3
	xg	194,2	22,1	94,1	19,3	70,1	5,6
6	x	19,9	7,6	3,6	0,7	7,8	0,8
	xg	11,4	4,9	2,1	0,5	2,3	0,2
7	x	19,3	15,7	2,5	1,2	3,7	0,4
	xg	18,9	14,8	2,3	1,2	3,4	0,3

n = počet vzorků; x = aritmetický průměr; xg = geometrický průměr

Tab. 20 Srovnání počtu CPM, CPP a Koli ve vzorcích analyzovaných na farmě (F – 1. sada) a v laboratoři (LB – 2. sada) pomocí párového t-testu (KLIMEŠOVÁ et al., 2021).

	CPM		CPP		Koli	
	F	LB	F	LB	F	LB
n = 21						
x (KTJ/ml)	12 500	15 700	2 800	2 600	159	172
xg (KTJ/ml)	8 000	9 200	1 100	1 000	47	50
sx (KTJ/ml)	13 000	19 100	3 800	3 300	290	340
log x (log KTJ/ml)	3,9053	3,9636	3,0467	3,0055	1,6751	1,6951
log sx (log KTJ/ml)	0,4374	0,4725	0,669	0,6742	0,7001	0,7012
	CPM F vs. LB		CPP F vs. LB		Koli F vs. LB	
stupně volnosti	20		20		20	
t	2,0135		1,6916		2,1187	
P-hodnota	0,0577		0,1062		0,0468	

n = počet vzorků; x = aritmetický průměr; xg = geometrický průměr; sx = směrodatná odchylka; log x = aritmetický průměr logaritmovaných hodnot; log sx = směrodatná odchylka logaritmovaných hodnot

Tab. 21 Srovnání počtu CPM, CPP a Koli ve vzorcích analyzovaných v laboratoři (L – 2. sada) a vzorků s Heeschovým činidlem (H – 4. sada) pomocí párového t-testu (KLIMEŠOVÁ et al., 2021).

	CPM		CPP		Koli	
	LB	H	LB	H	LB	H
n = 21						
x (KTJ/ml)	15 700	11 600	2 600	6 400	172	149
xg (KTJ/ml)	9 200	7 900	1 000	2 200	50	49
sx (KTJ/ml)	19 100	11 000	3 300	11 000	340	250
log x (log KTJ/ml)	3,9636	3,8993	3,0055	3,3135	1,6951	1,6925
log sx (log KTJ/ml)	0,4725	0,4145	0,6742	0,6736	0,7012	0,6596
	CPM LB vs. H		CPP LB vs. H		Koli LB vs. H	
stupně volnosti	20		20		20	
t	2,0087		2,0275		0,0592	
P- hodnota	0,0583		0,0561		0,9534	

n = počet vzorků; x = aritmetický průměr; xg = geometrický průměr; sx = směrodatná odchylka; log x = aritmetický průměr logaritmovaných hodnot; log sx = směrodatná odchylka logaritmovaných hodnot

Tab. 22 Průměrné hodnoty (KLIMEŠOVÁ et al., 2021) PSB (geometrický průměr) a ostatních složek mléka (aritmetický průměr).

farma	PSB (v tis/ml)	pH	SH (°SH)	T (g/100g)	B (g/100g)	L (g/100g)	TPS (g/100g)
1	170	6,75	8,67	3,98	3,53	5,05	9,26
2	173	6,75	7,89	4,08	3,20	4,98	8,87
3	84	6,74	7,94	3,86	3,18	4,98	8,86
4	212	6,71	8,49	4,04	3,50	4,93	9,11
5	257	6,73	7,66	4,18	3,07	4,89	8,66
6	148	6,72	8,32	3,92	3,56	4,98	9,24
7	237	6,71	8,59	3,80	3,41	4,95	9,04

PSB = počet somatických buněk; SH = titrační kyselost; T = tuk; B = bílkovina; L = laktóza; TPS = tukuprostá sušina