

Certifikovaná metodika INGO LA 09030 CM 21 - název:

Efektivní kalibrace techniky MIR-FT pro screening hodnoty ekvivalentu bodu mrznutí mléka v mléčných laboratořích na bázi referenčních hodnot výkonnostních testů

Certifikovaná uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) k řešení referenčně-rutinních systémů analytických laboratoří testace kvality syrového mléka pro zvýšení věrohodnosti výsledků.

I) Cíl certifikované uplatněné metodiky:

Cílem je rozšíření spektra vyšetřovacích metod a zajištění a zvýšení věrohodnosti výsledků a provozní jistoty managementu rutinních laboratoří při kontrole kvality mléka (podpora kvality mléčného potravinového řetězce).

Náplň certifikované uplatněné metodiky:

Implementace dosažených výsledků, získaných na základě předchozího výzkumu a vývoje a v rámci koordinační a konzultační metodické činnosti Národní referenční laboratoře pro syrové mléko (NRL-SM) Rapotín do prostředí laboratoří kontroly kvality mléka provozovaných Českomoravskou společností chovatelů, a.s. Praha.

Zdroj certifikované uplatněné metodiky:

Projekt INGO LA 09030 a výzkumný záměr MSM 2672286101 (RO0511 z 28. února 2011).

Zpracovali dne: 15. 11. 2012; Oto Hanuš^{1, 2}, Petr Roubal², Marcela Vyletělová², Ondřej Elich², Jaroslav Kopecký¹, Jiří Höfer², Jana Snášelová², Růžena Seydlová²; ¹ Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o., Rapotín; ² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha; dále Akreditovaná Zkušební laboratoř č. 1340; Národní referenční laboratoř pro syrové mléko (NRL-SM) v síti ANSES; Referenční laboratoř pracovní sítě referenčních mléčných laboratoří ICAR-CECALAIT a AMA-AFEMA.

Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů metodiky od 16. 11. 2012.

II) Vlastní popis certifikované metodiky

Efektivní kalibrace techniky MIR-FT pro screening hodnoty ekvivalentu bodu mrznutí mléka v mléčných laboratořích na bázi referenčních hodnot výkonnostních testů

Struktura certifikované metodiky:

- 1) Úvod
- 2) Cíl certifikované metodiky
- 3) Frekvence kalibrací
- 4) Postup ověření retrospektivní kalibrace
- 5) Praktické provedení metodiky
- 6) Závěr certifikované metodiky
- 7) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci certifikované metodiky
- 8) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky
- 9) Přílohové materiály s podklady pro vývoj certifikované metodiky

Hlavní použité zkratky:

AFEMA = Pracovní skupina pro podporu zdraví vemene a hygieny mléka v alpských zemích;
ANSES = Francouzská agentura bezpečnosti a hygieny potravin;
B nebo HB = hrubé bílkoviny;
BMM = bod mrznutí mléka;
ČSN = Česká státní norma;
EBMM = ekvivalent bodu mrznutí mléka;
ICAR = Mezinárodní výbor pro kontrolu užitkovosti zvířat;
IDF = Mezinárodní mlékařská federace;
L = monohydrát laktózy;
LRM = laboratoř rozborů mléka;
MIR = tradiční filtrová technologie infraanalýzy mléka;
MIR-FT = technologie infraanalýzy mléka s celým spektrem pomocí Michelsonova interferometru a s využitím Fourierových transformací;
NRL-SM = Národní referenční laboratoř pro syrové mléko;
PT = proficiency testing, výkonnostní testování analytické způsobilosti;
QA/QC = zajištění a řízení jakosti;
RE = Euklidická vzdálenost od počátku;
STP = sušina tukuprostá;
T = tuk.

1) Úvod a současný stav

Legislativní normové limity bodu mrznutí mléka

Bod mrznutí mléka (BMM, popř. MFP jako milk freezing point, nebo FPD freezing point depression) je důležitým fyzikálním a technologickým kvalitativním ukazatelem mléka. Většinou je používán pro kontrolu kvality syrového nebo pasterovaného mléka ve smyslu jeho případné falzifikace přídavkem cizí vody. To znamená pro kontrolu technologické disciplíny výrobců a zpracovatelů mléka. Voda může vniknout do mléka z dojícího zařízení jako nevyhnutelný přídavek nebo v důsledku špatné praxe při dojení (Buchberger, 1997). Některé země Evropské unie používají nyní legislativní diskriminační limity BMM (bodu mrznutí mléka) pro standardní kvalitu mléka od $\leq -0,520$ °C do $\leq -0,505$ °C (Buchberger, 1990 a, b, 1997; Rohm et al., 1991; Bossuyt, 2003). V České republice (CR) byl v předcházejícím období diskriminační limit $\leq -0,515$ °C pro syrové mléko. Nyní je stejný v souladu se současnou normou ČSN 57 0529, platný, ale nezávazný. Podle dřívější EEC 92/46 byl limit $\leq -0,520$ °C. Související předpisy (Regulation (EC) No. 853/2004 (No. 638/2004 Sb.)) již více neupřesňují. Pro pasterované mléko konzumní platí, že musí mít bod mrznutí v souladu se sběrnou oblastí (1234/2007). Pro syrové mléko nyní závazný limit chybí. 20,1 % dodávek syrového mléka do mlékáren v ČR však nevyhovuje limitu $\leq -0,520$ °C (Roubal, Kopunecz a Pešinová et al., 2005). Takové množství nemůže být zapříčiněno špatnou technologickou kázní, to znamená přídavky cizí vody. Je zjevné, že existuje diskrepance v určení tohoto limitu. Existovala ovšem také limitní hodnota $\leq -0,530$ °C (Klíčnick, 1978). To bylo spojeno s výrazně nižší mléčnou užitkovostí. Přibližně jedna polovina v porovnání k dnešku. Byla zdůrazněna možnost zhoršení průměru BMM rychlým vzrůstem mléčné užitkovosti v důsledku intenzivního šlechtění během posledních let (Hanuš et al., 2003, a).

Vlivy na bod mrznutí mléka

Hlavní vliv na BMM by mohl být přídavek cizí vody. Možný vliv prvního automatického dojícího systému (AMS) na zhoršení BMM by publikován nedávno (Rasmussen a Bjerring, 2005). BMM byly stabilizovány po zlepšení AMS. Frekvence BMM nad $-0,516$ °C byla 23 % v prvním roce s AMS a klesla v posledním roce na 2,2 %. Nicméně existuje více faktorů vedle přídavku cizí pitné vody, které mohou ovlivnit BMM (Freeman a Bucy 1967; Eisses a Zee, 1980; Buchberger, 1990, a, b, 1991, 1994, 1997; Wiedemann et al., 1993; Hanuš et al., 1998; Kološta, 2003). Všeobecně to mohou být faremní vlivy jako stádo krav, plemeno dojnic, dojivost stáda, sezóna, pastva, výživa a krmění krav a také jejich zdravotní stav ve smyslu výskytu produkčních poruch. Je velmi důležité správně rozlišovat mezi zmíněnými vlivy a reálným přídavkem cizí vody ve smyslu objektivního určení kvality mléka pro jeho proplácení a kontrolu kvality mléčného potravinového řetězce. To však není v praktických podmínkách vždy jasné. Existují další negativní technologické vlivy na pasterované mléko během jeho zpracování jako přídavek pitné vody nebo tepelný stres bílkovin (Rohm et al., 1991; Roubal et al., 2004). Ve skutečnosti všechny dodávky mléka do mlékáren na zpracování obsahují v mlékařsky vyspělých zemích do určitého stupně cizí vodu ve smyslu existence strojního dojení.

Složení a vlastnosti mléka a bod mrznutí mléka

Existuje více složek, které ovlivňují hodnotu BMM, hlavně v důsledku jejich osmotického tlaku. Více autorů (Demott 1969; Brouwer, 1981; Walstra a Jenness, 1984; Hanuš et al., 2003, b) oznámilo, že obsah laktózy způsobuje 53,8 % deprese BMM. Dále v klesajícím pořadí přibližně K^+ 12,7 %, Cl^- 10,5 %, Na^+ 7,2 %, citráty 4,3 %, urea 1,9 % a 6,9 % ostatní složky. Vliv obsahu kysličníku uhličitého v mléce a jeho odpařování nebyl studován pouze pomocí jeho odčerpání ale také pomocí přesycení mléka (Hanuš et al., 2011 a). Kysličník uhličitý

ovlivňuje bod mrznutí syrového a pasterovaného mléka v zpracovatelském řetězci průběžným poklesem v důsledku míchání, třepání a zahřívání. Jeho obsah klesá přibližně ze 7 na 2 objemová %.

Výsledky studií NRL-SM Rapotín v oblasti analýzy variability a stanovení BMM v abstraktivní formě jednotlivých prací

I) Bod mrznutí mléka (BMM) je důležitou fyzikální vlastností mléka a také možným ukazatelem porušení mléka přidávkou cizí vody. Je používán obecně ke kontrole kvality mléčného potravinového řetězce. Aktuální je diskuse o přijetí relevantního legislativního diskriminačního limitu (RLDL) BMM pro posouzení standardní kvality mléka. Cílem práce bylo přispět relevantními informacemi a vysvětlit vztahy mezi BMM a širokým spektrem ukazatelů mléka a zdravím dojnic a možné vlivy BMM na technologické vlastnosti mléka. Bylo analyzováno 76 bazénových vzorků mléka krav holštýnského (1, n = 36) a českého strakatého plemene (2, n = 40) na 48 mléčných ukazatelů. Krávy byly relativně zdravé, pokud jde o výskyt produkčních poruch a krmeny směsnou krmnou dávkou. Vzorky byly brány od února do června. Přídavek cizí vody byl vyloučen. Byla dokázána normální frekvenční distribuce (šikmost -0,039 oproti 0 a špičatost 2,093 oproti 3; $P > 0,05$) dat BMM ($1 = -0,5320 \pm 0,0050$ a $2 = -0,5202 \pm 0,0043$ °C) s velmi nízkými variačními koeficienty 0,9 a 0,8 %. 44 ukazatelů bylo korelováno k BMM regresními metodami. Vztahy nebyly vždy souhlasné mezi plemeny. Dojivost byla spojena s BMM ($r = -0,40$; $P < 0,05$). To dokládá nezbytnost modifikace diskriminačního limitu BMM v závislosti na šlechtění dojnic. Další vztahy ($P \leq 0,05$) byly mezi BMM a: celkovou sušinou ($r = -0,50$); sušinou tukuprostou (-0,33); hrubými bílkovinami (-0,32); čistými bílkovinami (-0,43); bílkovinami syrovátky (-0,47); mléčným tukem (-0,46); elektrickou vodivostí (-0,35); laktózou (-0,35); počtem somatických buněk (-0,36); poměrem tuk/bílkoviny (-0,36); kyselinou citronovou (0,47); Na (-0,34). Vztahy $P > 0,05$ byly mezi BMM a kaseinem, močovinou a acetonem. Sýrařské ukazatele také nebyly ovlivněny BMM, který však byl vztažen k ukazatelům fermentace mléka ($r =$ od -0,34 do -0,39, $P < 0,05$). Význam pro mlékařskou fermentační technologii je argument pro kontrolu kvality potravinového řetězce pomocí BMM a pro odhad jeho RLDL.

II) Deprese bodu mrznutí (FPD) je důležitá fyzikální vlastnost mléka. FPD je ovlivněna složením mléka, zejména složkami, které jsou spojeny s osmotickým tlakem a také ostatními fyziologickými faktory. Za určitých podmínek je podle FPD možné indikovat přídavek cizí vody (AFW) do mléka. Je nezbytné mít dobře odhadnutý legislativní diskriminační limit FPD pro takové účely kontroly kvality mléka. Tato práce byla zaměřena na získání informací pro možnost zlepšení tohoto odhadu. Vedle takových činitelů jako odhadnutý stav výživy dojnic, plemenný poměr u skotu a mléčná užitkovost dojnic je nezbytné zohlednit také odpařování CO_2 (CDE) a vodní páry a pasteraci (PAS) za technologických podmínek nebo technologickou manipulaci obsahu tuku. Zmíněné tři faktory byly testovány. Vlivy AFW (voda nasycená a nenasycená CO_2), CDE a PAS byly kvantifikovány a prokázány jako významné ($P < 0,001$). PAS zhoršení FPD bylo $-0,00394 \pm 0,00171$ °C. S ohledem na praxi pokusné CDE zhoršení by mohlo být $-0,00383 \pm 0,00095$ °C. FPD vzrůstá výrazně po dojení během technologického procesu uložení, mísení, pumpování, třepání během dopravy a zahřívání mléka. Během posunu FPD vzrůstá špičatost souborů dat FPD o kvalitě mléka. Tato skutečnost by měla být zohledněna v postupu odvození standardního diskriminačního limitu FPD pro syrové kravské mléko.

III) Deprese bodu mrznutí mléka (BMM) je velmi důležitou fyzikální vlastností. BMM je ovlivněn složením mléka, zejména složkami, které jsou spojovány s osmotickým tlakem a

také dalšími fyziologickými faktory. Za určitých okolností je hodnota BMM také možným ukazatelem porušení mléka přídavkem cizí vody. Proto je BMM používán obecně ke kontrole kvality mléčného potravinového řetězce. Je nezbytné mít dobře odhadnutý legislativní diskriminační limit BMM pro účely takové kontroly kvality mléka. Tato práce byla zaměřena na získání informací pro možnost zlepšit zmíněný odhad. Při odvození diskriminačního limitu BMM je nezbytné, vedle faktorů jako sezónní variace, odhadnutý stav výživy dojnic (ve smyslu rovnováhy dusík/energie pomocí kombinací obsahu močoviny a bílkovin nebo pomocí poměru tuk/hrubé bílkoviny), zastoupení plemene skotu, mléčné užitkovosti dojnic a ostatních podmínek země vzít v úvahu také možný přídavek cizí vody (technologicky nevyhnutelnou vodu – například kondenzační vodu – jako technický vliv strojního dojení), pasteraci, odpar kysličníku uhličitého a vodní páry za technologických podmínek, technologické manipulace s obsahem tuku a některé mléčné složky a vlastnosti (jako čisté a syrovátkové bílkoviny, počet somatických buněk, obsah močoviny a kyseliny citrónové nebo hodnotu titrační kyselosti). Dopady některých zmíněných činitelů na BMM a jejich vztahy k BMM jsou kvantifikovány v této práci. Byl hodnocen velký datový soubor ($n =$ od 11 540 do 72 607 bazénových vzorků syrového kravského mléka). Ačkoli se frekvenční distribuce měsíčních souborů BMM lišily významně od normálního modelu (ale především pro velký počet případů), rozdílly byly menší v důležitější šikmosti. Konvenční statistika tak byla použitelnou metodou vyhodnocení. U sezónního vlivu na BMM byla nejvyšší (nejhorší) hodnota na jaře ($-0,52097 \pm 0,004877$ °C; variabilita 0,9 %). Nejnižší (nejlepší) BMM byl na podzim ($-0,52516 \pm 0,005725$ °C; 1,1 %). Tento rozdíl byl významný ($P < 0,001$). To by mohlo být ovlivněno pravděpodobně kolísáním faktorů výživy a teploty vzdor použití kompletně míchané krmné dávky na bázi konzervovaných objemných krmiv pro výživu stád krav po celý rok. Měsíční vztahy mezi BMM a obsahem tuku byly prakticky téměř nezávislé. Patřícnější vztahy (determinace R^2) byly stanoveny mezi BMM a obsahem hrubých bílkovin, 0,0408 v lednu (korelace 0,20; $P < 0,001$). To znamená slabé zlepšování BMM se vzrůstem hrubých bílkovin. Efektivnější situace byla pozorována mezi BMM a obsahem laktózy. R^2 byl 0,1197 v květnu (r 0,35; $P < 0,001$). To znamená, že 12 % variability BMM je vysvětlitelných variabilitou obsahu laktózy. BMM klesá (je zlepšován) pravidelně s vyšším obsahem laktózy. Vztah mezi BMM a obsahem sušiny tukuprostě vzrůstal k r 0,31 ($P < 0,001$). Vztah mezi BMM a poměrem T/HB (tuk/hrubé bílkoviny) byl slabší. R^2 vzrůstal k 0,0215 v červenci (r -0,15; $P < 0,01$). Měsíční vztahy mezi BMM a obsahem kaseinu byly užší (r vzrůstal k 0,23 ($P < 0,001$) v lednu). 5,4 % variability v BMM je vysvětlitelných variacemi v obsahu kaseinu. Závislost BMM na koncentraci močoviny (M) byla také užší a kolísala k r 0,26 ($P < 0,001$) v březnu. Zvýšení M v mléce zlepšuje hodnotu BMM. Závislost BMM na koncentraci volných mastných kyselin v mléce byla docela nízká. Vztah mezi BMM a počtem somatických buněk byl slabý. Předpokládaný výživový stav mléčných stád ve smyslu rovnováhy dusíkaté látky/energie byl odhadnut podle kombinací obsahu močoviny a hrubých bílkovin v mléce. Nejhorší průměr BMM byl ve skupině s předpokládaným nedostatkem dusíkatých látek a energie ($-0,51855 \pm 0,007288$ °C). Nejlepší BMM byl ve skupině s předpokládaným přebytkem dusíkatých látek a energie v krmné dávce ($-0,52536 \pm 0,004785$ °C). Rozdíl byl významný ($P < 0,001$). BMM byly významně horší v případě podezření na deficit energie a riziko ketózy (na základě poměru tuk/hrubé bílkoviny) pokud toto bylo srovnáno k předpokladu normálně vyvážené výživy mléčných stád energií ($-0,52105 \pm 0,006436$ °C $>$ $-0,52244 \pm 0,005367$ °C; $P < 0,001$). Toto je významné pro správný odhad nového reálného legislativního diskriminačního limitu BMM pro specifické podmínky země. Výsledky o zdrojích variability BMM publikované v této práci jsou zajímavé pro zlepšení takového odhadu.

IV) Chov ovcí a koz se vrací do České republiky (ČR) kvůli možným pozitivním vlivům spotřeby alternativních mlék na lidské zdraví. To je důvod, proč je důležitá kontrola kvality tohoto mléka. Bod mrznutí mléka (BMM) je významný fyzikální ukazatel a je používán pro kontrolu kvality mléčného potravinového řetězce. Cílem této práce bylo analyzovat vztahy BMM k vybraným ukazatelům kvality mléka (MIs; s vazbou na zdraví vemene) prostřednictvím srovnání mezi kravami (reference), kozami a ovcemi. Bazénové vzorky mléka pocházely od tří mléčných stád krav plemene České strakaté (B, n = 93) a jednoho kozího a ovčího stáda (Bílá krátkosrstá, W, n = 60; Cigája, C, n = 60). Kozí a ovčí stádo bylo chováno v méně využitelné oblasti (LFA). Výživa zvířat všech druhů byla provedena za podmínek typických v ČR. Byly vyšetřeny následující MIs: DM, celková sušina; SNF, sušina tukuprostá; L, laktóza (vše v %); SCC, počet somatických buněk (10^3 ml^{-1}); EC, elektrická vodivost ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$); BMM, bod mrznutí mléka ($^{\circ}\text{C}$); Na, sodík a K, draslík jako makroprvky (v mg kg^{-1}). Kozí BMM byl $-0,5544 \pm 0,0293 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a lišil se ($P \leq 0,001$) od B BMM $-0,5221 \pm 0,0043$ a C BMM $-0,6048 \pm 0,0691 \text{ }^{\circ}\text{C}$. MIs u druhů přežvýkavců byly relativně normální s výjimkou vyšších SCC u koz a ovcí. Kravský BMM byl vztažen k L ($-0,36$; $P < 0,01$). Kozí BMM nebyl korelován k obsahu L ($-0,07$; $P > 0,05$) a ovčí BMM byl vztažen k L ($0,40$; $P < 0,01$). Zatímco kravské mléko bylo v souladu s deklarovanou účástí L na depresi BMM (54 %), překvapivě nestejně výsledky byly pozorovány u koz a ovcí. Tato skutečnost by mohla být vysvětlitelná zhoršenými geometrickými průměry SCC (horší zdravotní stav vemene) pro použitý kozí ($3\,646 \cdot 10^3 \text{ ml}^{-1}$) a ovčí ($560 \cdot 10^3 \text{ ml}^{-1}$) soubor ve srovnání ke kravskému ($159 \cdot 10^3 \text{ ml}^{-1}$). BMM byl u malých přežvýkavců těsněji spojen s DM a SNF (C $-0,70$ a $-0,67$; $P < 0,001$) než u krav ($-0,07$ a $-0,32$; $P > 0,05$ a $P < 0,05$) v důsledku vyšší DM a SNF. Pouze 0,5 a 10,5 % variací v BMM u krav bylo vysvětlitelných prostřednictvím variací v DM a SNF, ale již 32,7 a 12,8 % u koz a dokonce 49,4 a 45,0 % u ovcí. Vyšší hodnoty u ovcí byly zapříčiněny prostřednictvím vysoké variability BMM, 11,8 % (C) oproti 5,3 % (W) a 0,8 % (B). Podle získaných výsledků by bylo možné odvodit věrohodnější kvalitativní diskriminační limity BMM pro normy a účinnější pravidla pro monitoring a prevenci problémů kvality mléka u krav, koz a ovcí.

V) Z řady důvodů jsou potřebné kalibrace infračervených přístrojů pro rutinní měření složení syrového mléka pro hospodářské účely, jako je šlechtění zvířat nebo kontrola kvality potravinového řetězce. Národní referenční laboratoř pro syrové mléko (NRL-SM) Rapotín poskytuje sady referenčních vzorků mléka pro tyto kalibrace, organizuje výkonnostní testy relevantních metod a provádí validace metod a odhady nejistot výsledků měření. Úspěšná validace metody MIR-FT pro určení bodu mrznutí mléka (BMM) a močoviny (KMM) v laboratoři kontroly kvality a složení syrového mléka poskytla, podle výsledků výkonnostního testování, zdrojové hodnoty pro odhad rozšířené kombinované nejistoty výsledků měření: $\pm 0,0071893 \text{ }^{\circ}\text{C}$, tj. relativně $\pm 1,38 \%$ pro BMM; $\pm 4,451 \text{ mg}\cdot 100\text{ml}^{-1}$ a $\pm 15,9 \%$ pro KMM. Hodnoty jsou vhodné pro rutinní aplikaci v akreditované laboratoři. Určení BMM i KMM pomocí MIR-FT metody vykazuje dobrou shodu s referenčními metodami i referenčními hodnotami výkonnostních testů a má dobrý screeningový charakter.

Interpretace kvalitativního limitu BMM

Byly vedeny diskuse o diskriminační hodnotě bodu mrznutí mléka (BMM) a jejím určení ve smyslu legislativního vymezení standardní kvality mléka v podmínkách České republiky. Cílem bylo nalézt významné vztahy mezi hodnotami BMM a širokým spektrem ostatních ukazatelů (chemicko-složkových, fyzikálních, technologických a zdravotních) v syrovém kravském (ale i kozím a ovčím) mléce bez přídavku objemu cizí vody aby byly získány

příslušné informace. Tyto byly užitečné jako pomocný prostředek pro zlepšení věrohodnosti odhadu relevantního legislativního diskriminačního limitu BMM pro standardní kvalitu mléka. Takový postup je významný pro kontrolu kvality mléčného potravinového řetězce. Studie byly rovněž zaměřeny na testování vlivů přirozených variací BMM na technologické vlastnosti mléka a vysvětlení případných souvisejících zpracovatelských rizik (Hanuš et al., 2010, 2011 a).

Potřeba kontrolních mechanismů při mlékařské analytické práci

Referenční a zejména rutinní výsledky přímých a hlavně nepřímých metod analýz mléka jsou používány v hodnocení kvality mléka i kontrole mléčné užitkovosti v praxi. Podle těchto výsledků se platí mléko, ale i plemenný materiál. Výsledky jsou tak předmětem obchodu a proto také často cílem zpochybnění z jedné nebo druhé strany, často nepodloženými doklady. Teoreticky je každý výsledek jako odhad chybný a příslušné nejistoty z validačního (akreditačního) procesu udávají obor spolehlivosti výsledků pro oficiální srovnání. Věrohodnost výsledků a minimalizace výsledkových neshod je průběžně zajišťována účastí laboratoří ve výkonostním testování způsobilosti analytické práce v sítích referenčních a rutinních mléčných laboratoří podle známého schématu (Grappin, 1993; Leray, 1993). V současnosti roste význam screeningového, nepřímého, simultánního a sériového rutinního stanovení ekvivalentu bodu mrznutí mléka (Tomáška et al., 2005).

Referenční a kontrolní činnost pro referenční i rutinní mléčné laboratoře

Referenční sady vzorků mléka pro kalibraci nepřímých metod kontroly základního složení mléka (obsahy tuku (T), hrubých bílkovin (HB), laktózy (L), kaseinu (K), sušiny celkové (S), sušiny tukuprosté (STP)) v laboratořích Českomoravské společnosti chovatelů Praha poskytuje pravidelně akreditovaná (podle ČSN EN ISO/IEC 17025) zkušební Národní referenční laboratoř pro syrové mléko (NRL-SM) Výzkumného ústavu pro chov skotu v Rapotíně podle vlastních metodik za použití oficiálně uznaných referenčních metod (ČSN 57 0530). Těmi jsou metody: podle Röse-Gottlieba (T); podle Kjeldahla (HB, K); polarimetrická (L); gravimetrická (S a STP). NRL-SM také aktivně spolupracuje na souvisejících problémech v síti Národních referenčních laboratoří pro mléko a mléčné výrobky EU (AFSSA, Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Aliments) a jako člen kooperuje v pracovní síti referenčních mléčných laboratoří ICAR-CECALAIT (International Committee for Animal Recording - Centre d'Expertise et de Controle des Analyses Laitieres) a Sterntestech AMA-AFEMA (Agrar Markt Austria - Arbeitsgruppe zur Förderung von Eutergesundheit und Milchhygiene in den Alpenländern, e.V.). Další vývoj a implementace kalibračních metod mlékařských analýz může přispět k provozní jistotě referenčních i nepřímých metod v referenčních i rutinních mléčných laboratořích. S ohledem na stanovení ekvivalentu bodu mrznutí mléka (EBMM) je referenčním postupem metoda kryoskopická (ISO 5764:2009, IDF 108:2009; ČSN 57 0538; 638/2004; 1234/2007) s vyhledáním platu.

2) Cíl certifikované metodiky

Cílem metodiky bylo vyvinout, validovat a implementovat efektivní, tzn. náklady snižující, ale svou věrohodností výsledků adekvátní, retrospektivní postup kalibrace moderních instrumentálních nepřímých metod stanovení BMM pro kontrolu kvality mléka na základě derivace referenčních hodnot z verifikovaného systému výkonostního testování analytické způsobilosti (PT). Cílem vlastní certifikované metodiky je zvýšit provozní jistotu referenčních a rutinních mléčných laboratoří při nepřímém, sériovém a simultánním stanovení BMM:

- 1) podpořit vlastní systém centrální kalibrace nepřímé mlékařské analytické techniky pro stanovení obsahu BMM;
- 2) určit efektivní odvození referenčních hodnot vzorků syrového kravského mléka pro provedení kalibrací na BMM (MIR a MIR-FT);
- 3) určit statistické parametry kvality a akceptovatelnosti provedených kalibrací (MIR a MIR-FT) na BMM.

3) Frekvence kalibrací

Frekvence kalibrací metod MIR a MIR-FT pro určení ekvivalentu bodu mrznutí mléka (BMM) není legislativně závazně upravena. Materiály výrobců instrumentů doporučují intervaly měsíční až tříměsíční, výsledky provedených kruhových testů naznačují, při funkčnosti techniky (mimo závažné opravy optického nebo homogenizačního systému), že interval tříměsíční by mohl být uspokojivý. Uvedené odpovídá také v ČR aplikované frekvenci výkonnostního testování měření BMM (resp. EBMM) v referenčních i rutinních mléčných laboratořích.

4) Postup ověření retrospektivní kalibrace

Laboratorní síť a použité metody stanovení BMM (EBMM)

Národní referenční laboratoř pro syrové mléko (NRL-SM; akreditovaná podle ČSN EN ISO/IEC 17025; č. 1340, akreditační certifikát 81/2010) Raporin provozuje národní výkonnostní testování (PT) pro určení bodu mrznutí mléka v rámci její referenční činnosti (v kooperaci pod hlavičkou ANSES, Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Aliments) od roku 2007. Kontrolní sada obsahuje 10 vzorků mléka, nativních i modifikovaných ředěním přidávkem destilované vody pro zhoršení BMM a rozšíření výsledkového variačního oboru kontrolní sady a dále dva vodné roztoky kuchyňské soli v koncentraci blízké reálnému BMM (0,8149 a 0,8977 g vysušené NaCl na 100 ml destilované vody). Vzorky mléka jsou konzervovány bronopolem (DF Microtabs). Test je prováděn každé tři měsíce s cca 10 účastníky (laboratoře výzkumné, centrální chovatelské a mlékárenské v České republice, rovněž centrální na Slovensku). Zahrnuty jsou obvykle 2 metody (specifická kryoskopická) určení BMM včetně MIR-FT. Výsledky PT jsou doručeny formou zprávy do každé laboratoře v období dvou týdnů po provedení PT – statisticky derivované referenční hodnoty PT a vyhodnocení PT systémem Euklidické vzdálenosti na mléčných vzorcích včetně vyhodnocení testu na vzorcích vodních roztoků prostřednictvím Z-score a Youden plot (Grappin, 1987, 1993; Leray, 1993, 2006, 2009 a, b, c, 2010; Wood, 1994; Golc-Teger, 1996, 1997; Golc-Teger et al., 1996; Wood et al., 1998).

V NRL-SM byla použita pro stanovení BMM kryoskopická metoda a nepřímá metoda MIR-FT (Delta Instruments, Lactoscope FTIR, Holandsko). Ostatní pravidelní účastníci výkonnostních testů (OÚPT) metody podle seznamu a specifikace níže. Zde je naznačeno stručné metodické shrnutí:

- kryoskopická metoda podle ISO 5764:2002(E), IDF 108:2002(E), ČSN 57 0538, 638/2004, 1234/2007 a návodů výrobců přístrojů (obvykle Gerber Funke (Německo) a Advanced Instruments (USA));

- spektroskopická metoda v infračervené oblasti spektra (MIR a MIR-FT) na zařízeních Foss Electric (Dánsko, OÚPT), Delta Instruments (Holandsko, NRL-SM a OÚPT) a Bentley Instruments (USA, OÚPT), pokud tyto disponují příslušným programovým vybavením (regresní analýza) včetně měření konduktivity mléčného vzorku (schopnost měřit pouze mléko, nikoliv vodné vzorky, z principu kalibrace), byla kalibrována na desetibodové škále vzorků nativního mléka o různém BMM podle výsledků specifické kryoskopické referenční metody (NRL-SM; OÚPT), nebo nově odvozeným efektivním referenčním postupem (tato certifikovaná metodika) retrospektivně podle referenčních hodnot z PT (přijetí kalibrace cca 10 dní po PT v NRL-SM a kooperující centrální mléčné laboratoři ve Slovenské republice).

Metody vyhodnocení výsledků

Rutinní výkonnostní testy (PT) jsou v případě BMM vyhodnocovány systémem Euklidické vzdálenosti od počátku (Leray, 1993, 2006 a 2010; Golc-Teger, 1996; Hanuš et al., 1998) a Z-score v Youden plot (Wood, 1994; Wood et al., 1998; Fuchs, 2000). Výsledky kalibrace byly hodnoceny podle průměrné difference vůči referenčním hodnotám, směrodatnou odchylkou tohoto průměru individuálních diferencí ($n = 10$ referenčních hodnot v sadě) popřípadě korelačním koeficientem (validační) vztahu referenčních a instrumentálních hodnot po přijetí kalibrace. Základními statistickými metodami a popisem byly z výsledků PT ($n = 26$ za období 6,5 roků od června 2004 do února 2011) hodnoceny vybrané ukazatele. Detailnější vyhodnocení, resp. validace retrospektivní kalibrace, bylo provedeno selektivně za období posledních 3,5 roku a 14 PT, to je z periody aplikace nepřímé metody MIR-FT (Lactoscope FTIR, Delta Instruments) pro měření BMM v NRL-SM. Hodnoceny byly ukazatele jako průměrná odchylka od počátku (systematická chyba), její směrodatná odchylka diferencí metody od referenčních hodnot (náhodná chyba) a pořadí účastníka v PT podle Euklidické vzdálenosti.

Celkový stav vývoje a stavu v PT u měření BMM

Kalibrace nepřímých validovaných metod a účast v PT jsou nezbytné podmínky akreditačních auditů. Laboratoř může kalibrovat nepřímou metodu na BMM podle zakoupených mléčných referenčních standardů nebo podle výsledků své vlastní referenční metody (kryoskop) na vhodné sadě mléčných vzorků.

V rutinních mléčných laboratořích často chybí referenční metody. Jejich pořízení, včetně příslušného profesně zdatného analytického personálu je nákladné. Také nákup referenčních standardů a účast v PT představuje často vyšší náklady. Hledání úspor vede vývojově k myšlence praktické realizace retrospektivního principu efektivní kalibrace (RPEK) na základě derivace a kalibračního použití referenčních hodnot z výsledků PT. Moderní analyzátoři MIR a MIR-FT umožňují takovou dodatečnou kalibraci po získání výsledků z PT. Důležitým předpokladem ovšem je, že počet účastníků v PT (odborníků, metod) zvyšuje pravděpodobnost věrohodnosti odvozovaných referenčních hodnot.

Bylo provedeno 26 PT pro stanovení BMM. Základní situace PT je v Tab. 1. Průměrná hodnota % neúspěšnosti v PT byla 23,9 a je ovlivněna charakterem rozptylu hodnot výsledků v PT. Když je vyšší počet účastníků, přiblíží se soubor odchylek výsledků od referenčních hodnot charakteru normální frekvenční distribuce (modelu Gaussovy křivky). Pak jsou pro nastavení PT typické podobné hodnoty % neúspěšnosti jako zde.

V Tab. 2 a na Obr. 1 je uveden vybraný příklad výsledku PT (NRL-SM) pro BMM, který naznačuje variabilitu analytických výsledků, jejich diagnostické trendy k systematickým a náhodným chybám (souřadnice d a sd v Obr. 1) a tím dosahovanou věrohodnost výsledků

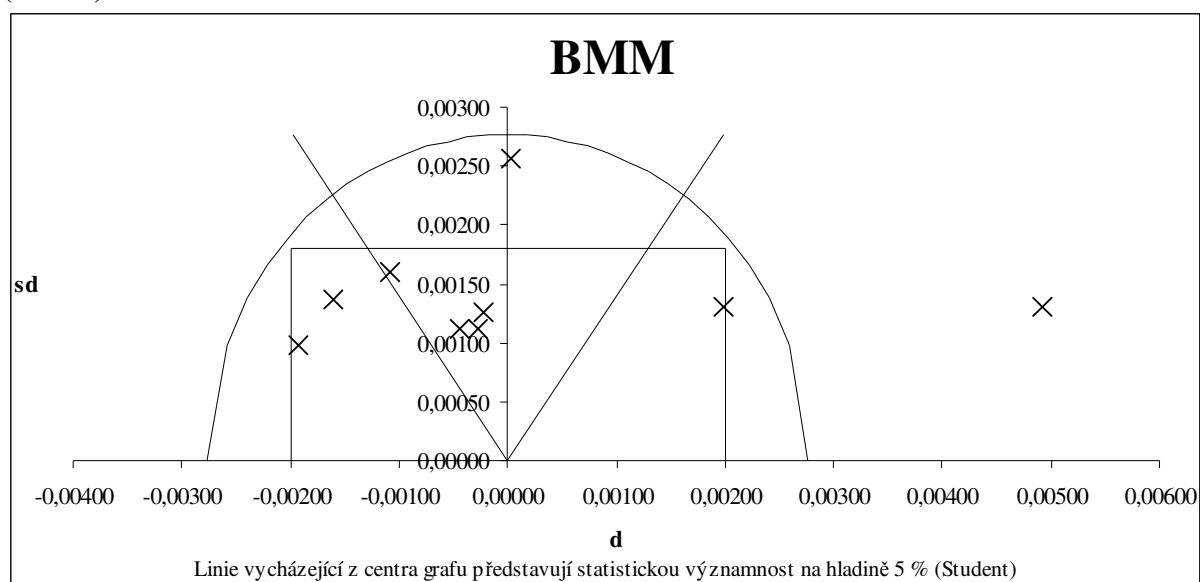
měření v praxi rutinních laboratoří. U PT pro BMM lze hovořit o plnohodnotnosti v praxi rutinních mléčných laboratoří a regulérnosti jako podkladu pro akreditační audity. Na Obr. 2 je zobrazen příklad PT pro BMM ve dvou vodných roztocích NaCl pouze pro kryoskopickou metodu s podobnou diagnostickou účinností pro laboratorní personál. Hodnoty BMM v reálně použitých sadách vzorků se pohybovaly od -0,5370 do -0,4960 °C.

Výsledky uvedené jako statistické charakteristiky (průměr \bar{x} a směrodatná odchylka s_x) hodnot d a sd (vedle Euklidické vzdálenosti hlavních charakteristik PT) souborů všech účastníků (I; Tab. 3) z PT a jen úspěšných účastníků (II; Tab. 4) ukazují srovnání jejich variability. Toto srovnání z obou pohledů, jak s_x pro d tak \bar{x} pro sd , naznačuje logicky výrazně nižší hodnoty pro soubor II (Tab. 4) u testovaného ukazatele BMM.

Tab. 1 Dosavadní charakteristiky výkonnostního testu (PT) pro BMM z NRL-SM.

Ukazatel	BMM
Počet PT	26
Počet účastníků celkem (opakovaně)	184
Průměrný počet účastníků v PT	7,08±1,87
Počet neúspěšných účastníků	44
Průměrný počet neúspěšných účastníků	1,69±0,74
% neúspěšných účastníků	23,9

Obr. 1 Graf Euklidické vzdálenosti výkonnostního testu (PT) analytické způsobilosti stanovení bodu mrznutí mléka (BMM; °C) metodami kryoskopie, MIR a MIR-FT z NRL-SM (Tab. 1).



d = průměrná odchylka; sd = variabilita průměrné difference. Linie vycházející z centra grafu představují významnost odchylek, kdy body pod liniemi jsou významně odchýlené ($P \leq 0,05$), nad liniemi nevýznamně ($P > 0,05$). Půlkruh vymezuje úspěšný výsledek (hladina spolehlivosti 90 % pro RE), obdélník velmi úspěšný výsledek.

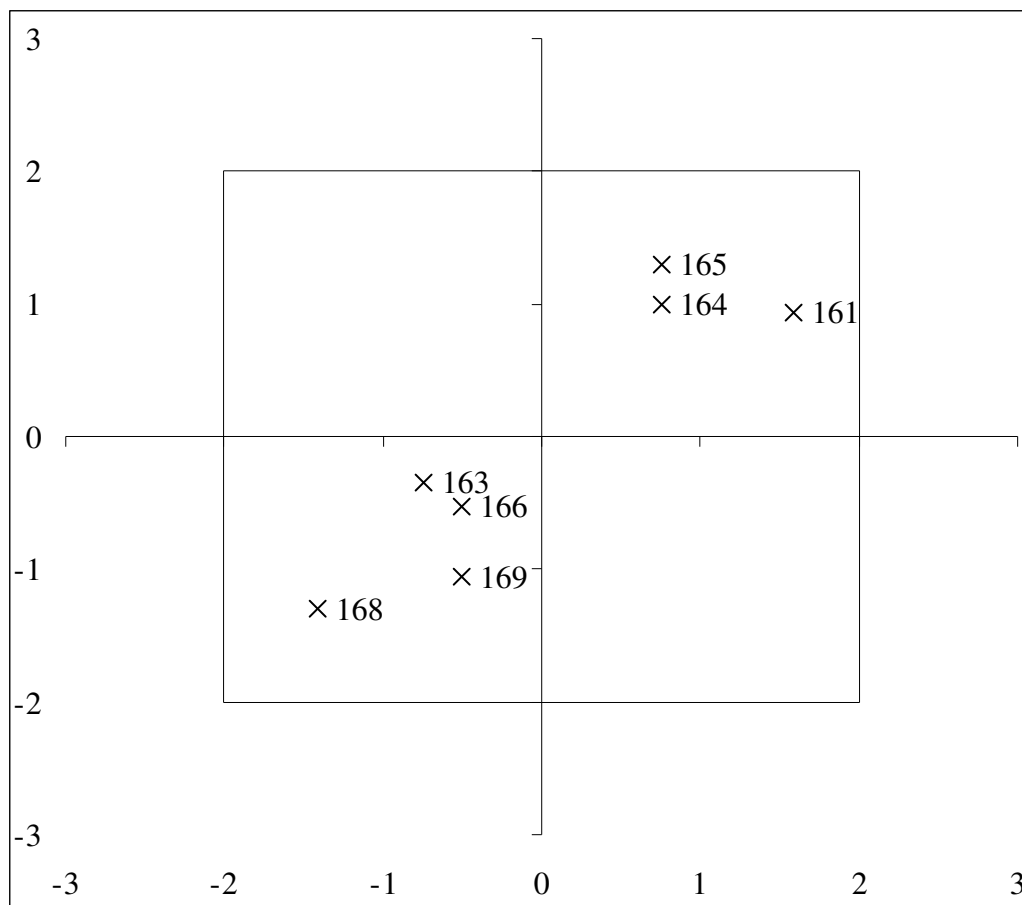
Tab. 2 Výsledky výkonnostního testu (PT) analytické způsobilosti stanovení deprese bodu mrznutí mléka (BMM; diference v °C) metodami kryoskopie, MIR a MIR-FT z NRL-SM.

u	d	sd	RE	t	význ.
165	-0,00028	0,00112	0,00115	0,79	ns
168	-0,00044	0,00112	0,00120	1,24	ns
164	-0,00023	0,00126	0,00128	0,58	ns
167	-0,00108	0,00160	0,00193	2,13	ns
166	-0,00160	0,00137	0,00211	3,69	**
169	-0,00193	0,00098	0,00216	6,23	***
163	0,00198	0,00131	0,00237	4,78	***
162	0,00003	0,00256	0,00256	0,04	ns
161	0,00492	0,00130	0,00509	11,97	***
D	0,0014	0,0014			
sD	0,0020	0,0004			

C
 C
 C
 C
 C
 C
 C
 C
 N → diskriminační limit úspěšnosti

u = účastník (přístroj); d = průměrná diference LAB-REF (°C; laboratoř – referenční hodnota); sd = směrodatná odchylka průměru individuálních rozdílů; RE = Euklidická vzdálenost od počátku; t = hodnota kritéria párového t-testu; význ. významnost rozdílu (ns = $P > 0,05$; * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$; *** = $P \leq 0,001$); N = nevyhověl; D = průměr d a sd; sD = směrodatná odchylka D pro d a sd.

Obr. 2 Zobrazení PT stanovení bodu mrznutí (°C) vodných roztoků NaCl kryoskopicky (2 vzorky) z NRL-SM.



Zobrazení pozice a čísla účastníka standardizované podle směrodatné odchylky z PT (osa x vzorek 1 a osa y vzorek 2), rámce úspěšnosti účasti v hodnotě ± 2 sigma, úhlopříčka stoupající zleva doprava značí polohu s ohledem na systematickou chybu a úhlopříčka stoupající zprava doleva značí polohu v relaci k chybě náhodné z hlediska analyticko-diagnostické účinnosti grafu.

Tab. 3 Statistické charakteristiky (průměr \bar{x} a směrodatná odchylka s_x) hodnot d a sd souborů všech účastníků (I) z PT pro BMM (°C).

Ukazatel		d	sd
BMM	N	184	184
	\bar{X}	0,0000203	0,0019995
	S_x	0,0032808	0,0022453

n = počet účastníků všech PT; \bar{x} = aritmetický průměr; s_x = směrodatná odchylka; d = průměrná diference LAB-REF (°C; laboratoř – referenční hodnota); sd = směrodatná odchylka průměru individuálních rozdílů.

Tab. 4 Statistické charakteristiky (průměr \bar{x} a směrodatná odchylka s_x) hodnot d a sd souborů jen úspěšných účastníků (II) vybraných z PT pro BMM (°C).

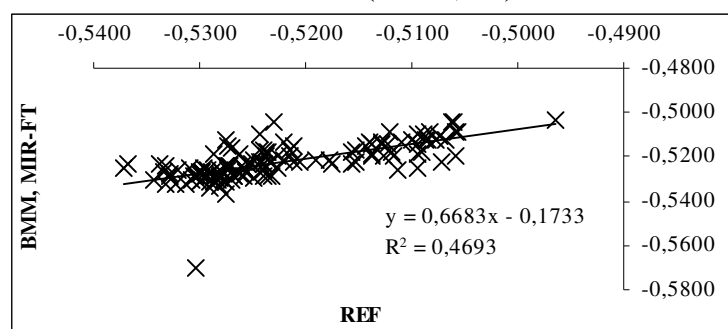
Ukazatel		d	sd
BMM	n	140	140
	\bar{x}	0,000220	0,001259
	s_x	0,001711	0,000546

Použití retrospektivní kalibrace metody MIR-FT na měření BMM podle referenčních výsledků z PT

Následné přijímání retrospektivní kalibrace MIR-FT na měření BMM podle referenčních (REF) hodnot z PT přineslo průměrný kalibrační korelační koeficient z predikce odhadu $0,804 \pm 0,162$ ($n = 10$; Tab. 5) MIR-FT k REF. Korelační koeficienty kolísaly od $0,538$ ($P > 0,05$) do $0,958$ ($P < 0,001$). Stejná hodnota z prvního měření PT pro referenční metodu CRYO činila $0,991 \pm 0,009$ ($n = 14$; $P < 0,001$; Tab. 5) a korelační koeficienty kolísaly od $0,966$ ($P < 0,001$) do $0,998$ ($P < 0,001$). Srovnání výsledků vychází výrazně lépe pro referenční metodu CRYO. Regresní výpočet kalibrační korelace ze všech vzorků PT za uvažované období je pro metodu MIR-FT uveden na Obr. 3 (kontrolní měření ve formě predikce; $0,685$; $P < 0,001$). Totéž u metody CRYO jako první validační měření v PT je na Obr. 4 ($0,978$; $P < 0,001$). Srovnatelnost hodnot korelace je slabší. Možnost přijetí postupu retrospektivní kalibrace existuje, nicméně analytická hodnota nepřímého postupu MIR-FT pro BMM je pouze screeningová. Lze uvést i vybrané lepší příklady individuálních kalibrací (pro MIR-FT) a výsledky PT (pro CRYO) na Obr. 5 a 6 ($0,875$ a $0,882$ ($P < 0,001$); $0,997$ ($P < 0,001$)).

Ve stejném období opakované retrospektivní kalibrace byla průměrná odchylka od referenčních hodnot po přijaté kalibraci MIR-FT podle reference PT (predikční vyjádření) průměrně $-0,000123 \pm 0,001399$ °C ($n = 13$). Průměrná směrodatná odchylka tohoto průměrného rozdílu od referenčních hodnot činila $0,0062 \pm 0,003339$ °C. Vhodností screeningového stanovení ekvivalentu BMM v kontrole kvality syrového kravského mléka metodou MIR a MIR-FT za využití simultánního měření konduktivity se pozitivně zabývali někteří autoři (Koops et al., 1989; Buchberger a Klostermeyer, 1995; Crombrugge, 2003; Tomáška et al., 2005; Hanuš et al., 2009 a).

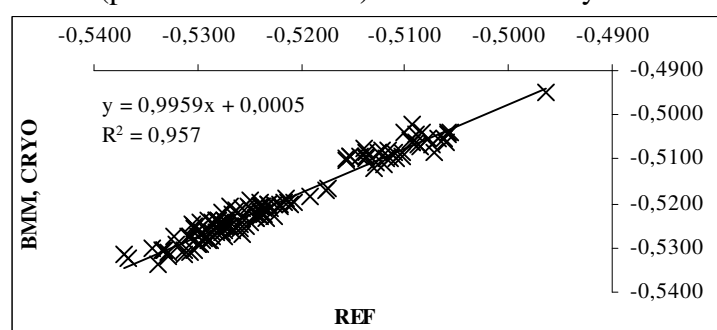
Obr. 3 Regresní výpočty korelace ze všech vzorků PT za uvažované období pro metodu MIR-FT (kontrolní měření (KM) ve formě predikce) k referenčním výsledkům PT (REF) pro měření bodu mrznutí mléka (BMM; °C).



$r = 0,685^{***}$

$n = 130$

Obr. 4 Regresní výpočet korelace ze všech vzorků PT za uvažované období pro metodu CRYO (první reálné měření) k referenčním výsledkům PT (REF) pro měření BMM (°C).

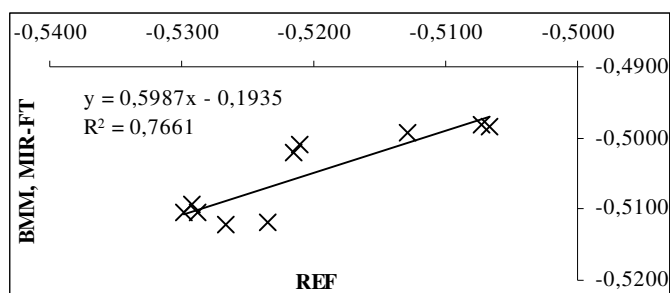


$r = 0,978^{***}$

$n = 140$

Obr. 5 Vybrané výsledky regrese individuální retrospektivní kalibrace metody MIR-FT (1. měření (PM) a kontrolní měření (KM) ve formě predikce; n = 10) k referenčním výsledkům PT (REF) pro měření BMM (°C).

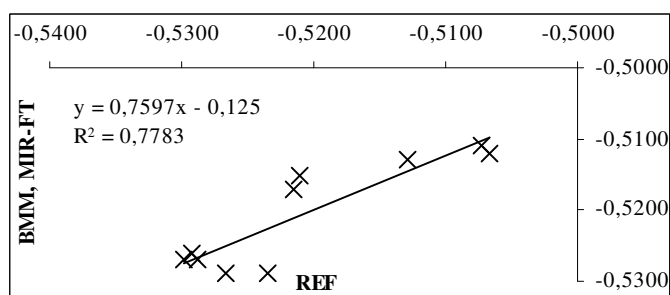
PM



$r = 0,875^{***}$

$n = 10$

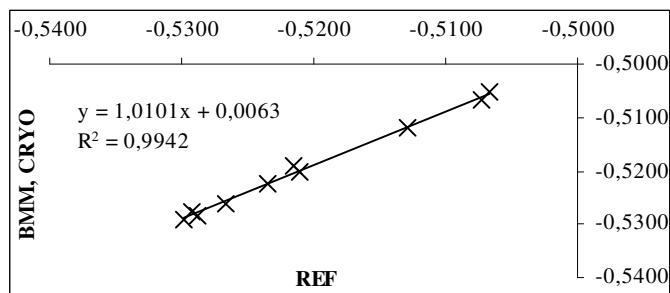
KM



$r = 0,882^{***}$

$n = 10$

Obr. 6 Vybraný výsledek regrese individuálního PT (metoda CRYO, 1. měření - validace) podle referenčních výsledků (REF) pro měření BMM (°C).



$r = 0,997^{***}$

$n = 10$

Tab. 5 Výsledky metod MIR-FT při aplikaci retrospektivní kalibrace a CRYO při určení BMM (°C) v regulérním PT.

Metoda	xr	xd	xsd
MIR-FT	$0,804 \pm 0,162$	$-0,000123 \pm 0,001399$	$0,0062 \pm 0,003339$
CRYO	$0,991 \pm 0,009$	viz Tab. 6	viz Tab. 6

xr = průměrný korelační koeficient mezi hodnotami metody a referenčními hodnotami v PT; xd = průměr průměrných rozdílů od referenčních hodnot; xsd = průměr směrodatných odchylek individuálních rozdílů od referenčních hodnot.

Validace retrospektivního způsobu kalibrace nepřímé metody MIR-FT na měření BMM podle reference z PT

Validaci retrospektivního kalibračního postupu je možné udělat hodnocením jeho výsledků v následném PT, po cca 10 týdnech od přijetí kalibrace v daném laboratorním systému.

V období opakovaného použití retrospektivního způsobu kalibrace BMM v NRL-SM byla úspěšnost metody MIR-FT v PT (Tab. 6) 10,0 % a průměrné pořadí v testu $8,5 \pm 0,5$. Průměrná odchylka od referenčních hodnot se pohybovala od $-0,01378$ do $0,01737$ ($n = 10$) s průměrem $-0,001462 \pm 0,010408$ °C ($n = 10$). Směrodatná odchylka průměrného rozdílu od referenčních hodnot v PT se pohybovala od $0,00238$ do $0,01277$ ($n = 10$) s průměrem $0,00578 \pm 0,003146$ °C ($n = 10$). Srovnání korespondujících ukazatelů kryoskopické metody (CRYO) ve stejné době v NRL-SM bylo: úspěšnost v PT 85,7 %; průměrné pořadí v testu $4,9 \pm 2,2$; průměrná odchylka od referenčních hodnot od $0,00069$ do $0,00492$ ($n = 10$) s průměrem $0,002591 \pm 0,001332$ °C ($n = 14$); směrodatná odchylka průměrného rozdílu od referenčních hodnot od $0,00061$ do $0,00237$ ($n = 10$) s průměrem $0,00115 \pm 0,0006$ °C ($n = 14$). To vykazuje poměrně špatné srovnatelné hodnoty zvolených ukazatelů mezi metodami (Tab. 6). Výsledky také ukazují, že metoda MIR-FT se s ohledem na princip vyhodnocování PT mohla jen velmi málo podílet na odvozování referenčních hodnot v PT. Projevil se tak výraznější rozdíl v analytické hodnotě metod ve prospěch metody referenční oproti nepřímé.

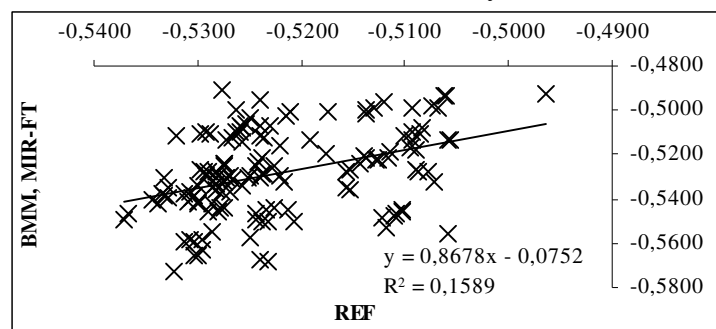
Výsledky MIR-FT jsou pro určení BMM zřetelně horší, což potvrzuje pouze screeningovou hodnotu metody pro posunutý pozitivní výběr vzorků při kontrole kvality syrového mléka. Negativně posouzené vzorky musí být zkoumány metodou CRYO, aby ještě cca polovina negativně označených vzorků (MIR-FT) mohla být vrácena do skupiny standardní kvality mléka. Za takových okolností a s ohledem na výše uvedené korelační koeficienty kalibrace (na hranici přijatelnosti) lze metodu MIR-FT na měření BMM retrospektivně kalibrovat s přijetím žádoucího posunu pro splnění výše uvedené podmínky pozitivního výběru. Korelační koeficient výsledků BMM metody MIR-FT k referenčním hodnotám v PT za celé období je na Obr. 7 a není analyticky vůbec nijak výrazný $0,399$ ($P < 0,001$). Celkově pak byly výsledky validace kalibrace metody MIR-FT na měření BMM v PT zřetelně horší v porovnání k charakteristikám vlastního výsledku kalibrace s ohledem na získané kalibrační korelační koeficienty (Obr. 7 a 3; $0,399$ ($P < 0,001$) $< 0,685$ ($P < 0,001$)).

Tab. 6 Výsledky validace metod MIR-FT po aplikaci retrospektivní kalibrace a CRYO při určení BMM (°C) v regulérním PT.

Metoda	% +	x Poř.	xd	Xsd
MIR-FT	10,0	$8,5 \pm 0,5$	$-0,001462 \pm 0,010408$	$0,00578 \pm 0,003146$
CRYO	85,7	$4,9 \pm 2,2$	$0,002591 \pm 0,001332$	$0,00115 \pm 0,0006$

+ = úspěšnost v PT; x Poř. = průměrné pořadí v PT.

Obr. 7 Regresní výpočet korelace ze všech vzorků PT za uvažované období pro metodu MIR-FT (1. reálné měření) k referenčním výsledkům PT (REF) pro měření BMM (°C).



$r = 0,399***$

$n = 140$

Možnost aplikace výsledků v praxi

Použité soubory (zejména Tab. 3, 4, 5, 6) poskytují informace z dlouhodobé řady pro případné výpočty některých metodických limitů v příslušném PT a systému retrospektivní kalibrace. Např. umožňují 1,96 násobky s_x pro 95%ní interval spolehlivosti a model normální frekvenční distribuce pro některou z charakteristik PT nebo retrospektivní kalibrace (d , s_d , r). Takové výpočty jsou pak významné při validaci a akreditaci zmíněného postupu PT a kalibrace v jednotlivých laboratořích systému laboratorní sítě a při následných akreditačních auditech.

Spolehlivost ověřených (statisticky očištěných a deklarovaných) referenčních hodnot z PT, při nezbytné podstatné účasti referenčních metod v PT, je pak pravděpodobně vyšší než při aplikaci referenčních hodnot jedné referenční metody při kalibraci nepřímého postupu měření BMM v konkrétní laboratoři.

Činnost pracovních laboratorních sítí PT (proficiency testing) je tedy možné efektivně a efektivně (pouze s nákladem na PT, ale bez nákladů na pořízení referenčních standardů pro kryoskop nebo pro MIR-FT) využít pro nabytí validovaných referenčních hodnot ke kalibraci moderních přístrojů (MIR a MIR-FT) v rutinních mléčných laboratořích. Důležitým předpokladem však je, aby účastníky PT v daném případě (nutno mít pragmaticky ověřeno) pro uvedený ukazatel (bod mrznutí mléka) byla použita nejméně přes 50 % případů metoda referenční (nikoliv nepřímá). Znamená to, že metod s nepřímým principem měření by mělo být ve skupině PT méně než polovina. Použití navržené metody také předpokládá pravidelnou kontrolu funkcí a vlastností přístroje (obecně opakovatelnost měření, stabilitu nastavení - pilotními vzorky, účinnost výplachu, přijatelnou chybu z přenosu atp.) a jejich pozitivní výsledky, zejména v období od účasti v PT do případného přijetí uvedené kalibrace.

Zmíněný retrospektivní postup kalibrace je možné principiálně aplikovat na všechny nepřímě (MIR a MIR-FT) měřené mléčné ukazatele. Přesto, aby byla respektována standardizace, ho lze doporučit jen pro ukazatele metodicky nestandardizované (jako EBMM, koncentrace močoviny v mléce, volné mastné kyseliny, kyselina citrónová, ketony), ale ne pro standardizované (BMM, tuk, bílkoviny, kasein, laktóza, sušina tukuprostá). Nicméně, při jakékoliv relevantní kalibraci má nepřímá metoda MIR nebo MIR-FT určení BMM věrohodnost výsledků a analytický význam pouze na screeningové úrovni.

5) Praktické provedení metodiky

Příprava referenčních standardů

Vzorky mléka

Kontrolní sada vzorků obsahuje 10 reprezentativních vzorků vyváženě od obou hlavních dojených plemen skotu (holštýnské a české strakaté) v České republice s potřebnou škálou hodnot bodu mrznutí mléka. Vzorky mléka v testu jsou upraveny z hlediska variačního rozpětí hodnot sledované vlastnosti mléka vzájemnou kombinací nativních BMM a také pomocí umělé manipulací (ředění destilovanou vodou u vybraných vzorků mléka). Škála se pak pohybuje cca od -0,532 do -0,511 °C.

Vodné roztoky

Výchozím předpisem pro přípravu kontrolních vodných roztoků NaCl je norma 91/180/EHS (Rozhodnutí komise ze 14. února 1991 ukládající určité metody analýz a testování syrového mléka a tepelně ošetřeného mléka). Jsou připraveny dva vodné roztoky NaCl v testu označené čísly 11 a 12. Koncentrace roztoku č. 11 je 8,149 g.l⁻¹, koncentrace roztoku č. 12 činí 8,977 g.l⁻¹. NaCl je pro tento účel sušený při teplotě 300 ± 25 °C po dobu 5 hodin nebo při teplotě

130 ± 1 °C po dobu nejméně 24 hodin. Takto vysušený NaCl je chlazen při pokojové teplotě v účinném exikátoru. Očekávané hodnoty bodu mrznutí pro jednotlivé roztoky jsou: roztok č. 11, -0,483 °C; roztok č. 12, -0,531 °C.

Transport sad referenčních vzorků

- Mléko je konzervováno čistým bronopolem (2-bróm, 2-nitro, 1, 3 propandiol, 0,02 až 0,04 %) v jednom objemu po vzorek a rozpipetováno do subvzorkovnic pro škály (sady) jednotlivých uživatelů (účastníků) až po dokonalém rozpuštění konzervačního činidla. Činidlo přitom musí být rozpuštěno šetrným mícháním – mírné překlápění nádob pro jednotlivé vzorky.

- Vzorky v kontrolních sadách se vychladí na 5 až 7 °C (cca 3 až 4 hodiny), vloží do termoboxu s chladicími vložkami a transportují šetrně při teplotě do 9 °C.

- Transport vzorků referenční sady musí být co nejšetrnější s ohledem na čas, teplotu a mechanické namáhání. Bylo dokázáno experimentálně i výsledky praktické činnosti, že praktikovaný systém transportu je použitelný (SOJKOVÁ et al., 2009) pro účely organizace výkonnostního testování určení BMM a EBMM.

- V laboratořích se vzorky zahřejí (max. 30 °C), rehomogenizují a duplicitně měří na BMM nebo EBMM za podmínek metod.

Referenční hodnoty

- Referenční hodnoty PT pro jednotlivé vzorky se stanoví u organizátora PT (NRL-SM) jako aritmetické průměry vzorků z měření všech laboratoří po Grubbsově testu odlehlosti (0,05 %). Vypočtou se průměrné odchylky a variability odchylek laboratoří od referenčních hodnot a Euklidické vzdálenosti laboratoří od středu.

- V PT musí být zahrnuto více než polovina účastníků s referenční metodou určení BMM a jen méně než polovina účastníků s nepřímou metodou (EBMM).

Předání výsledků na rutinní pracoviště

Po výpočtu a validaci jsou referenční hodnoty PT pro jednotlivé vzorky deklarovány rozeslaným protokolem do rutinních laboratoří, elektronickou poštou ve formě oficiální tabulky. Je uvedena konvenční rozšířená kombinovaná nejistota výsledků měření referenční metody stanovená statisticky pro výsledky referenční metody v referenční centrální laboratoři.

Vlastní kalibrace rutinních infraanalyzátorů

- Vlastní kalibrace přístrojů MIR a MIR-FT na měření EBMM na principu základního modelu lineární regresní analýzy signálů očištěných od interferenčních efektů při simultánní zpravidla multikomponentní analýze, měření konduktivity mléka a regresním výpočtu výsledku se zohledněním složení mléka (v pořadí klesající důležitosti: konduktivita, laktóza, tuk, bílkoviny) proběhne podle příslušných návodů výrobců zařízení, případně specifických standardních operačních postupů.

- Referenční hodnoty jsou do databáze přístroje vloženy se zpožděním (cca 10 dní) a je přijata kalibrace.

- Validační korelace mezi hodnotami referenčními a predikovanými by měla být vyšší než 0,65 a směrodatná odchylka průměrné difference by měla být nižší než 0,002468 (0,001259 Tab. 4 krát 1,96 pro 95 % intervalu spolehlivosti) °C.

- Průměrná validační odchylka od referenční hodnoty je akceptovatelná do hodnoty 0,001711 (Tab. 4) °C.

- Použití navržené metody také předpokládá pravidelnou kontrolu funkcí a vlastností přístroje (obecně opakovatelnost měření, stabilitu nastavení - pilotními vzorky, účinnost výplachu, přijatelnou chybu z přenosu atp.) a jejich pozitivní výsledky, zejména v období od účasti v PT do případného přijetí uvedené kalibrace.

- Uvedený retrospektivní princip kalibrace lze z důvodů respektování standardizace doporučit jen pro ukazatele metodicky nestandardizované (jako EBMM) a nikoliv pro standardizované (BMM, tuk, bílkoviny, kasein, laktóza, sušina tukuprostá).

6) Závěr certifikované metodiky

Popsaný postup a vyhodnocené výsledky doložené v přílohách, o které se postup v zásadě opírá, poskytují možnost technicky uplatnit nově ověřenou efektivní retrospektivní metodu kalibrace analýzy MIR-FT u důležité fyzikální vlastnosti mléka na principu vyhodnocení výsledků výkonnostního testování pro možnost kontroly kvality mléka a zlepšení monitoringu zdravotního stavu dojnic, obecně k podpoře provozní jistoty laboratorního personálu a rovněž chovatelů.

III) Srovnání „novosti postupů“ a předání certifikované metodiky: Efektivní kalibrace techniky MIR-FT pro screening hodnoty ekvivalentu bodu mrznutí mléka v mléčných laboratořích na bázi referenčních hodnot výkonnostních testů:

- vyvinutá certifikovaná metodika byla předána do užívání systému laboratoří kontroly kvality mléka a kontroly užítkovosti ČMSCH a. s. v elektronické i písemné formě 16. 11. 2012;
- jedná se o nový postup efektivní kalibrace pro měření a rozšíření spektra stanovovaných mléčných ukazatelů v laboratořích kontroly kvality mléka a mléčné užítkovosti. Tato skutečnost je doložena příloženými vlastními publikovanými výsledky. Uvedené postupy reference jsou v laboratořích používány krátce právě v souvislosti s vývojem metodiky a uvedené postupy kontroly měření nebyly doposud v konkrétních laboratořích používány.

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

- kontrola existence a aplikace certifikované uplatněné metodiky jako pracovního postupu pro efektivní retrospektivní kalibraci stanovení ekvivalentu bodu mrznutí mléka metodou MIR-FT v mléčných laboratořích je proveditelná prostřednictvím revize dokladů a dokumentů o prováděných pracovních postupech a výsledcích při kalibracích a kontrole infraanalýzátorů

v Laboratoři rozborů mléka v Buštěhradu a v Brně-Tuřanech a popřípadě v některých laboratořích na Slovensku, tedy na pracovištích klientů, především ČMSCH a.s. a ve vlastní mléčné laboratoři Výzkumného ústavu pro chov skotu v Rapotíně;

- certifikovaná uplatněná metodika obsahuje technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) k řešení referenčně-rutinních systémů analytických laboratoří k testaci kvality syrového mléka;

- certifikovaná uplatněná metodika byla zpracována v šesti exemplářích a předána v kroužkové vazbě na příslušná pracoviště.

V) Ekonomické aspekty

Ekonomický dopad je součástí kontroly kvality mléka zdravotního stavu dojníc (výživy), prevenční práce s ohledem na rizika v mlékařství a poradenství ke kvalitě mléka. Zlepšením kvality výsledků zde může tvořit podíl do 10 % efektu ve smyslu zajištění zlepšené kontroly kvality mléka a prevence ztrát způsobených nedostatkem informací, které mohou tvořit podle odhadů zřetelné obchodní ztráty. Objem případných ztrát je ovšem obtížné vyčíslit konkrétněji neboť závisí na objemu produkce farmářů. Na úrovni ČR se pak může jednat o částky v řádu milionů.

Náklady na konkrétní zavedení postupu uvedeného v metodice mohou pro uživatele (mléčnou laboratoř) činit podle kvalifikovaného odhadu v laboratořích v ČR celkem 1 tis. Kč (poplatky za provedení výkonnostních testů) ročně. Činnost se periodicky aktualizuje, ročně činí její zavedení 4 tis. Kč. Přínos pro uživatele (laboratoře) v podobě tržeb za provedené rutinní analýzy (odhad 4 000 analýz individuálních vzorků měsíčně krát 12 činí 48 000 analýz krát 10 Kč za analýzu je 480 000 Kč ročně. Efekt je opakovatelný po rocích.

VI) Seznam použité související literatury

7) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky

AEBI, R.- BÜHLMANN, G.: Der FAM-Zellzahl-Standard. AFEMA Tagung, Mosonmagyaróvár 2000, a.

AEBI, R.- BÜHLMANN, G.: Qualitätssicherung der Zellzahlbestimmung. AFEMA Tagung, Mosonmagyaróvár 2000, b.

ARNDT, G.- WEISS, H.- UBBEN, E. H.: Der Gehalt somatischer Zellen in der Rohmilch: Beiträge zu Messung, Interpretation und praktischer Bedeutung für Milchqualität und Mastitisbekämpfung. I. Statistische Verfahren zur Beurteilung der Datenqualität von Ringversuchsergebnissen, dargestellt am Beispiel der Zählung somatischer Zellen in Milch. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte, 43, 1991, 167-178.

BARBANO, D.: Reference system and centralized calibration for milk (payment) testing. Proc. of 36th ICAR biennial session, Niagara Falls, USA, June 2008, ICAR Technical series no. 13, ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X, 2009, 315-316.

BAUCH, W.- HUBER, B.- BUCHBERGER J.: Zum Einfluss einiger Parameter auf die Bestimmung des Gefrierpunktes von Milk mit den Cryostar II – LC. DMZ, Deutsche

- Milchwirtschaftliche Zeitschrift, Lebensmittel und Milchwirtschaft, 114, 5, 1993, 112-114.
- BAUMGARTNER, C.: Reference system – Principle and practice. In: Proceedings of the 35th biennial session of ICAR, EAAP publication No. 121, Breeding, production recording, health and the evaluation of farm animals, Kuopio, Finland, June 2006, 2007, 309.
- BAUMGARTNER, C.: The way to reference systems and centralised calibration for milk recording testing. Present status in Germany. Proc. of 36th ICAR biennial session, Niagara Falls, USA, June 2008, ICAR Technical series no. 13, ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X, 2009, 307.
- BROUWER, T.: Calculations concerning the determination of the freezing-point depression of milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 1981, 35.
- BUCHBERGER, J.: Einfluss von Rasse, Laktationsstadium und Untersuchungsfehler auf den Gefrierpunkt der Milch. *Schule und Beratung*, 11/90, 1990 a, IV-9-11.
- BUCHBERGER, J.: Erfahrungen mit der Gefrierpunktuntersuchung der Milch. *Sborník VÚCHS Rapotín „Management chovu dojnic“*, duben 1997.
- BUCHBERGER, J.: Probleme auch ohne Fremdwasser? *Top Agrar*, 2, 1991, R24-R26.
- BUCHBERGER, J.: Ursachen von Überschreitungen des Grenzwertes von $-0,515\text{ }^{\circ}\text{C}$ beim Gefrierpunkt der Milch. *Schule und Beratung*, 9-10, 1990 b, IV-8-10.
- BUCHBERGER, J.: Zum Gefrierpunkt der Milch: Bewertung und Interpretation. *DMZ, Deutsche Milchwirtschaftliche Zeitschrift*, 115, 8, 1994, 376-383.
- BUCHBERGER, J.- KLOSTERMEYER, H.: Determination of freezing point in milk with the „System 4000 Milko-Scan“ from Foss Electric A/S. *DMZ, Deutsche Milchwirtschaftliche Zeitschrift*, 23/24, 1995, 1-14.
- CASTANEDA, R.: Reference system and centralized calibration for milk recording testing in Argentina. Proc. of 36th ICAR biennial session, Niagara Falls, USA, June 2008, ICAR Technical series no. 13, ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X, 2009, 309-313.
- COVENEY, L.: Milk testing proficiency scheme, Round 26 – November 2001. Example laboratory, Savant Technologies, 2001, 12.
- CROMBRUGGE VAN, J. M.: Freezing Point. *Bulletin of IDF*, 383, 2003, 15-22.
- ČSN 57 0530: Methods for testing of milk and milk products (In Czech). Vydavatelství úřadu pro normalizaci a měření, 1973, Praha.
- ČSN 57 0536: Determination of milk composition by mid-infrared analyzer. (In Czech) Český normalizační institut, 1999, Praha.
- ČSN 57 0538, 1998: Determination of freezing point in milk – cryoscope method. Czech Office for normalization and measurement, Prague.
- DEMOTT, B. J.: Relationship of freezing point of milk to its specific gravity and concentration of lactose and choride. *J. Dairy Sci.*, 52, 6, 1969, 882.
- EEC 92/46, Council Directive: Milk and milk product quality. *Official Journal*, L 268, 14/9, 1-32.
- EISSES, J.- ZEE, B.: The freezing point of autentic cow's milk and farm tank milk in the Netherlands. *Neth. Milk Dairy J.*, 34, 1980, 162-180.
- FREEMAN, T. R.- BUCY, J. L.: Distribution of milk freezing points in authentic herd samples. *J. Dairy Sci.*, 50, 6, 1967, 951.
- FUCHS, M.: Der AFEMA-Sternstest: ein Beitrag zur internationalen Harmonisierung der Rohmilchanalytik. XXVIII ÓVÁRI TUDOMÁNYOS NAPOK, Mosonmagyaróvár 2000, 71-75.
- GOLC-TEGER, S.: Slovenia in the European network of dairy laboratories. V: 5th International Symposium "Animal Science Days", Opatija, 23. - 26. September 1997. *Animal science days, Agriculturae Conspectus Scientificus*, 62, 1997, 37-40.
- GOLC-TEGER, S.: Zagotavljanje kakovosti analiz v mlekarstvih laboratorijih = Analytical quality assurance in dairy laboratories. V: 1. slovenski mednarodni kongres Mleko in

- mlečni izdelki, Portorož, Slovenija, 20. - 22. September 1995. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, 1996, 279-283.
- GOLC-TEGER, S.- POGAČAR, J.- VALINGER, E.: The Slovenian dairy laboratories proficiency testing scheme. V: Analytical quality and economic efficiency in dairy food laboratories: abstracts. Sonthofen, International Dairy Federation (IDF), AOAC International, German Dairy Association, 1996, 3.
- GOŁĘBIEWSKI, M. – BRZozowski, P. – GOŁĘBIEWSKI, L.: Analysis of lactation curves, milk constituents, somatic cell count and urea in milk of cows by the mathematical model of Wood. *Acta Vet. Brno*, 80, 2011, 73-80.
- 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.
- 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.
- CHLÁDEK, G.- ČEJNA, V.: The relationships between freezing point of milk and milk components and their changes during lactation in Czech Pied and Holstein cows. (In Czech) *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LIII, 5, 2005, 63-70.
- ISO 5764:2009, IDF 108: 2009: International standard. Milk – Determination of freezing point – Thermistor cryoscope method (Reference method) 15.
- JANŠTOVÁ, B.- DRAČKOVÁ, M.- NAVRÁTILOVÁ, P.- HADRA, L.- VORLOVÁ, L.: Freezing point of raw and heat-treated goat milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 52, 11, 2007, 394-398.
- JANŠTOVÁ, B.- DRAČKOVÁ, M.- DLESKOVÁ, K.- CUPÁKOVÁ, Š.- NECIDOVÁ, L.- NAVRÁTILOVÁ, P.- VORLOVÁ, L.: Quality of raw milk from a farm with automatic milking system in the Czech Republic. *Acta Vet. Brno*, 80, 2011, 207-214.
- KIRCHNEROVÁ, K.- FOLTYS, V.: The biochemical parameters of milk quality in relationship to freezing point. (In Slovak) *Sborník: XXXII. seminář o jakosti potravin a potravinových surovin*. Brno MZLU, 2005, 17.
- KLÍČNÍK, V.: *Technologie živočišných produktů (Mlékářství)*. SPN, VŠZ Brno, 1978, 270.
- KOLOŠTA, M.: Effect of pasture dairy cow nourishment level on the milk freezing point. (In Slovak) *Mliekarstvo*, 34, 3, 2003, 25-27.
- KOOPS, J.- KERKHOF MOGOT, M. F.- VAN HEMERT, H.: Routine testing of farm tank milk by infra-red analysis. IV Prediction of the freezing-point depression from infra-red measurements and conductivity. *Neth. Milk Dairy J.*, 43, 1989, 3-16.
- LERAY, O.: CECALAIT: an organization to support analytical quality assurance in dairy laboratories. Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories. Sonthofen / Germany, 1992 -05-18/20, Brussels, 1993, 349-360.
- LERAY, O.: Reference and calibration system for routine milk testing – advantages / disadvantages, choice criteria. 3rd ICAR reference laboratory network meeting – Kuopio, Finland – 6th June, 49-65. Breeding, production recording, health and the evaluation of farm animals. EAAP publication No. 121, 2007, Proceedings of the 35th biennial session of ICAR, ISBN: 978-90-8686-030-2, 2006, 311-317.
- LERAY, O.: Update on ICAR reference laboratory network. Identification, breeding, production, health and recording of farm animals. Proc. of 36th ICAR biennial session, Niagara Falls, USA, June 2008, ICAR Technical series no. 13, ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X, 2009 a, 291-294.
- LERAY, O.: ICAR AQA strategy – International anchorage and harmonisation. Proc. of 36th ICAR biennial session, Niagara Falls, USA, June 2008, ICAR Technical series no. 13,

- ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X, 2009 b, 295-300.
- LERAY, O.: Interlaboratory reference system and centralised calibration – Prerequisites and standard procedures. Proc. of 36th ICAR biennial session, Niagara Falls, USA, June 2008, ICAR Technical series no. 13, ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X, 2009 c, 301-305.
- LERAY, O.: Analytical precision performance in ICAR proficiency testing programmes. ICAR 37th Annual Meeting, Riga, Latvia, 31 May – 4 June, 2010.
- MICHALAK, W.: Porównanie oznaczeń zawartości białka w mleku wykonywanych przez Laboratoria Wojewodzkich Stacji Oceny Zwierząt. Biul. Inst. Gen. Hodow. Zwierząt PAN, 27, 1972.
- MICHALAK, W.- CYNALEWSKA, H.- OCZKOWICZ, H.: Collaborative testing among laboratories routinely testing fat and protein milk. J. Dairy Sci., 61, 1978, 1634-1636.
- ORDER 638/2004 about veterinary demands on milk and milk products (In Czech).
- ORDER 1234/2007 (In Czech).
- RASMUSSEN, M. D.- BJERRING, M.: Development of bulk milk quality from herds with automatic milking system. 26th - 28th April, ICAR Technical Series – No 10, Physiological and Technical Aspects of Machine Milking, Nitra, Slovak Republic, 2005, ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-07-3, 71-86.
- REGULATION (EC) No. 853/2004.
- ROHM, H.- PLESCHBERGER, C.- FOISSY, F.: Der Gefrierpunkt pasteurisierter Milch in Österreich. Ernährung / Nutrition, 15, 11/12, 1991, 667-671.
- ROUBAL, P.- SNÁŠELOVÁ, J.- BUCHVALDKOVÁ, T.: The freezing point of the raw and heat treated cow milk. (In Czech) Proceeding of seminar contributions of VÚCHS Rapotín: The actual problems of management in the cattle keeping, 2004, 71-76.
- SHERBON, J. W.: Collaborative study of the Pro-Milk method for the determination of protein in milk. Journal of the AOAC, 58, 4, 1975, 770-772.
- TOMÁŠKA, M.- HOFERICOVÁ, M.- KOLOŠTA, M.: The measurement of equivalent of milk freezing point. (In Slovak) Mliekarstvo, 36, 4, 2005, 7-9.
- 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.
- WALSTRA, P.- JENNESS, R.: Dairy Chemistry and Physics, 1984, New York – Chichester – Brisbane – Toronto – Singapore.
- WIEDEMANN, M.- BUCHBERGER, J.- KLOSTERMEYER, H.: Ursachen für anomale Gefrierpunkte der Rohmilch. Dtsch. Milchwirtsch. Zeitschr., 1. und 2. Mitteilung, 114, 1993, 22, 634-644, 114, 23, 1993, 656-663.
- WOOD, R.: Proficiency testing and accreditation of food analysis Laboratories. 1. Conference on practical application of European legislation on foodstuffs. Bled, Slovenia 1994-10-517, Ljubljana, 1994, 55-65.
- WOOD, R.- NILSSON, A.- WALLIN, H.: Role of proficiency testing in the assessment of laboratory quality. In Quality in the food analysis laboratory. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1998, 172-202.

VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

8) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci certifikované metodiky

- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- VYLETĚLOVÁ, M.- LANDOVÁ, H.- JEDELSKÁ, R.: The relationships between goat and cow milk freezing point, milk composition and properties. Sci. Agric. Boh., 39, 4, 2008, 324-328.
- HANUŠ, O.- BENDA, P.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Design and evaluation of the first national

- qualitative testing of routine milk analyses. (In Czech) *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. (Brno)*, XLVI, 3, 1998, 33-53.
- HANUŠ, O.- BJELKA, M.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- KOZÁKOVÁ, A.- PODMOLÍKOVÁ, M.- GENČUROVÁ, V.: Šlechtitelské a technologické aspekty bodu mrznutí mléka a prevence případných problémů. Šlechtitelské a technologické aspekty chovu dojených krav a kvality mléka (zejména s ohledem na bod mrznutí): sborník referátů VÚCHS Rapotín, ISBN 80-903142-1-X , 2003 a, 81-97.
- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- TOMÁŠKA, M.- VYLETĚLOVÁ, M.- GENČUROVÁ, V.- KUČERA, J.- TRINÁCTÝ, J.: The analysis of relationships between chemical composition, physical, technological and health indicators and freezing point in raw cow milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 55, 1, 2010, 11-29.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- MACEK, A.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- ZAJÍČKOVÁ, I.: Zajištění kvality výsledků analýz složení mléka modifikacemi testů laboratorní způsobilosti. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, XLVIII, 173, 1, 2006, 1-19.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- ŠTOLC, L.- KLÍMOVÁ, Z.- MOTYČKA, Z.- KOPECKÝ, J.: Validace a nejistoty měření koncentrace močoviny a bodu mrznutí mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR-FT) pro laboratoře kvality mléka. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, LI, 186, 2, 2009 a, 40-53.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- KUČERA, J.- VYLETĚLOVÁ, M.- TRINÁCTÝ, J.: Analyse of relationships between freezing point and selected indicators of udder health state among cow, goat and sheep milk. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LVII, 5, 2009 b, 103-110.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- KUČERA, J.- TRINÁCTÝ, J.: The effects of milk indicators of sheep mammary gland health state on some milk composition and properties. *Folia Veterinaria*, 53, 4, 2009 c, 208-216.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- LANDOVÁ, H.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: The comparison of relationships between milk indicators in different species of ruminants in the Czech Republic. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, L, 183, 3, 2008 a, 35-44.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- LANDOVÁ, H.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: The effect of goat udder health on composition and properties of raw milk. *Folia Veterinaria*, 52, 3-4, 2008 b, 149-154.
- HANUŠ, O.- HANUŠOVÁ, K.- VYLETĚLOVÁ, M.- KOPEC, T.- JANŮ, L.- KOPECKÝ, J.: Selected abiotic factors influencing raw cow milk freezing point depression. *Acta Veterinaria Brno*, 81, 1, 2012, 49-55.
- HANUŠ O.- KLIMEŠ M.- MIHULA P.- KOZÁKOVÁ A.- JEDELSKÁ R.: Impacts of the sampling of milk and the basic milk treatment on its freezing point and other compositional parameters. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, XLV, 164, 4, 2003 b, 10-17.
- HANUŠ, O.- VYLETĚLOVÁ, M.- GENČUROVÁ, V.- HULOVÁ, I.- LANDOVÁ, H.: Differences of some indicators of raw milk properties and especially mineral composition between small ruminants as compared to cows in the Czech Republic. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LVI, 5, 2008 c, 51-56.
- HANUŠ, O.- VYLETĚLOVÁ, M.- TOMÁŠKA, M.- SAMKOVÁ, E.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: The effects of sample fat value manipulation on raw cow milk composition and indicators. Vlivy manipulace s obsahem tuku ve vzorku na ukazatele složení a vlastností kravského mléka. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, ISSN 1211-8516, LIX, 1, 2011 b, 101-112.
- HANUŠ, O.- ZHANG, Y.- BJELKA, M.- KUČERA, J.- ROUBAL, P.- JEDELSKÁ, R.: Chosen biotic factors influencing raw cow milk freezing point. Vybrané biotické činitele ovlivňující bod mrznutí syrového kravského mléka. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, ISSN 1211-8516, LIX, 5, 2011 c, 65-82.

MACEK, A.- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- KOPECKÝ, J.: The relations of sheep's and cow's freezing point of milk to its composition and properties. Sci. Agric. Boh., 39, 4, 2008, 329-334.

SOJKOVÁ, K.- HANUŠ, O.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Stanovení teplotního gradientu mezilaboratorního transportu vzorků mléka. Determination of thermogradient for interlaboratory milk sample transport. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, LI, 187, 3, 2009, ISSN 0139-7265, 35-41.

Ne všechny práce ze seznamu literatury (7, 8), jejichž studium a poznatky byly využity ve vývoji metodiky, jsou citovány explicitně v textu vlastní metodiky pro praxi. Jsou však uvedeny v 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: 15. 11. 2012

Za zhotovitele:

Doc. Dr. Ing. Oto Hanuš

.....

Výsledky řešení metodického problému byly formou vyhodnocení zpracovány pro publikace v odborném tisku.

Certifikovaná metodika pro praxi byla podporována řešením projektu INGO LA 09030 a výzkumného záměru MSM 2672286101 (RO0511 z 28. února 2011) a aktivitami Národní referenční laboratoře pro syrové mléko Rapotín.

9) Přílohové materiály s podklady pro vývoj certifikované metodiky

Přílohy této certifikované uplatněné metodiky (Efektivní kalibrace techniky MIR-FT pro screening hodnoty ekvivalentu bodu mrznutí mléka v mléčných laboratořích na bázi referenčních hodnot výkonnostních testů) tvoří vlastní výsledky vývoje a metodického testování tzn., publikace, případně manuskripty budoucích publikací a grafické zpracování statistických dat.

Přílohy

- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- TOMÁŠKA, M.- VYLETĚLOVÁ, M.- GENČUROVÁ, V.- KUČERA, J.- TRINÁCTÝ, J.: The analysis of relationships between chemical composition, physical, technological and health indicators and freezing point in raw cow milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 55, 1, 2010, 11-29.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- KUČERA, J.- VYLETĚLOVÁ, M.- TRINÁCTÝ, J.: Analyse of relationships between freezing point and selected indicators of udder health state among cow, goat and sheep milk. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LVII, 5, 2009, 103-110.
- HANUŠ, O.- HANUŠOVÁ, K.- VYLETĚLOVÁ, M.- KOPEC, T.- JANŮ, L.- KOPECKÝ, J.: Selected abiotic factors influencing raw cow milk freezing point depression. *Acta Veterinaria Brno*, 81, 1, 2012, 49-55.
- HANUŠ, O.- VYLETĚLOVÁ, M.- TOMÁŠKA, M.- SAMKOVÁ, E.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: The effects of sample fat value manipulation on raw cow milk composition and indicators. Vlivy manipulace s obsahem tuku ve vzorku na ukazatele složení a vlastností kravského mléka. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, ISSN 1211-8516, LIX, 1, 2011, 101-112.
- HANUŠ, O.- ZHANG, Y.- BJELKA, M.- KUČERA, J.- ROUBAL, P.- JEDELSKÁ, R.: Chosen biotic factors influencing raw cow milk freezing point. Vybrané biotické činitele ovlivňující bod mrznutí syrového kravského mléka. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, ISSN 1211-8516, LIX, 5, 2011, 65-82.