

Certifikovaná metodika RO1419 CM 38 - název:

Postup přípravy standardních vzorků pro hluboké zmražení a aplikaci ve výkonnostním testování analytické způsobilosti při určení složení mléka nepřímými metodami

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 k testaci kvality syrového mléka a pro zvýšení věrohodnosti výsledků.

I) Cíl certifikované uplatněné metodiky:

Cílem certifikované metodiky RO1419 CM 38 je rozšíření portfolia kontrolních metod a zajištění a zvýšení věrohodnosti výsledků a provozní jistoty managementu rutinních laboratoří při kontrole složení a kvality mléka pro účely kontroly užitkovosti (individuální vzorky mléka - podpora šlechtění zvířat) a proplácení mléka (bazénové vzorky mléka - zajištění kvality mléčného potravinového řetězce) a také podpora postupů pro zajištění kladného průběhu relevantních oficiálních mezinárodních auditů, např. ICAR.

Náplň certifikované uplatněné metodiky:

Náplní certifikované metodiky RO1419 CM 38 je implementace dosažených výsledků, získaných na základě předchozího výzkumu a vývoje v rámci řešení projektů MZe RO1419 a NAZV KUS QJ1230044, do prostředí rutinní kontroly kvality syrového mléka a analýz mléka v kontrole užitkovosti v různých zemích EU pro podporu spolehlivosti dat ke šlechtitelské práci v chovu dojeného skotu, pro celkové zlepšení věrohodnosti hodnocených dat a pro podporu kvality mléčného potravinového řetězce.

Zdroj certifikované uplatněné metodiky:

Projekty MZe RO1419 a NAZV KUS QJ1230044.

Zpracovali dne: 4. 11. 2019; Oto Hanuš¹, Marcela Klimešová¹, Gustav Chládek², Petr Roubal¹, Radoslava Jedelská¹, Jaroslav Kopecký¹; ¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha; ² Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav chovu a šlechtění zvířat.

Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů metodiky od 21. 12. 2019.

ISBN: 978-80-904348-8-2

II) Vlastní popis certifikované metodiky

Postup přípravy standardních vzorků pro hluboké zmražení a aplikaci ve výkonnostním testování analytické způsobilosti při určení složení mléka nepřímými metodami

Struktura certifikované metodiky:

1) Současný stav problematiky – rámcový úvod

Význam analýz kvality syrového mléka

Význam správnosti výsledků analýz syrového mléka

Podpora kvality v mlékařských analytických systémech

Neexistence zlatého standardu v mlékařských analýzách

Mlékařský analytický systém a základní mléčné ukazatele

Nejčastěji používané principy u rutinních mlékařských analýz

Kontrola kvality referenčních i rutinních výsledků chemických analýz v mlékařství ke kalibracím a ve výkonnostních testech v ČR

Produkce vlastních referenčních materiálů v RL-SM

Výkonnostní testování ve vazbě na kalibraci – specifita mlékařských analýz

Výkonnostní testování analytické způsobilosti mlékařských laboratoří

Testování analytické způsobilosti rutinních mlékařských laboratoří v ČR

Vývoj hluboce zamražených pilotních vzorků mléka pro kontrolu stability infraanalýzy

2) Cíle certifikované metodiky

3) Vlastní vývoj pro certifikovanou metodiku – testování postupů a metod, validace dat přípravy sady základního složení mléčných standardů pro proficiency testing

I) Modelový testovací soubor na bázi individuálních vzorků mléka

II) Modelový testovací soubor na bázi bazénových vzorků mléka

III) Doporučené podmínky a postupy přípravy sady vzorků (mléčných standardů) pro výkonnostní testy analytické způsobilosti měření základního složení mléka pro nepřímé metody po hlubokém zmražení a dlouhodobém uložení (jádro certifikované metodiky)

4) Závěr certifikované metodiky

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 tématicky relevantní certifikované metodiky k problematice provedení a kontrole analýz mléka v kontrole mléčné užitkovosti a kontrole jakosti syrového mléka

Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech

7) Přílohové materiály s podklady pro vývojovou práci v rámci certifikované metodiky

zamrazene_mleko První test Příloha 1
vzorky-pred-zamrazenim_2019-0924 Příloha 2
vzorky-po-zamrazení_2019-1004 Příloha 3
vzorky-po-zamrazení_2019-1015 Příloha 4
vzorky-po-zamrazení_2019-1025 Příloha 5

Nejčastěji použité zkratky:

ČR = Česká republika;
B = obsah bílkovin;
CF = České strakaté;
ČMSCH = Českomoravská společnost chovatelů;
H = Holštýn;
HB = hrubé bílkoviny;
ICAR = Mezinárodní výbor pro kontrolu užitkovosti zvířat;
KU = kontrola mléčné užitkovosti;
L = obsah monohydrátu 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;
PSB = počet somatických buněk;
PT = proficiency testing, výkonnostní testování analytické způsobilosti;
RL-SM = referenční laboratoř pro syrové mléko;
T = obsah tuku.

1) Současný stav problematiky – rámcový úvod

Současná doba klade velmi vysoké nároky na kvalitu syrového kravského mléka a následně i mléčných potravinových produktů, v EU stále zdaleka nejvyšší v porovnání ke světovému vývoji. Mléčný potravinový řetězec je nejlépe kvalitativně kontrolovaným ze všech ostatních, a proto utrpěl v porovnání k dalším relativně méně potravinových skandálů v nedávné historii, kdy je tato otázka zvláště citlivě společensky vnímána i kontrolována (HANUŠ et al., 2018). Pro kontrolu kvality syrového mléka, která byla (BAUMGARTNER et al., 2000; HANUŠ et al., 2000, 2007 b, 2008 a; MILLÁN-VERDÚ et al., 2003) a je (MARTÍNEZ de la VARA et al., 2018) stále velmi aktuální, jsou nezbytné věrohodné výsledky analýz vzorků mléka.

Význam analýz 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 dojníc 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. 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 správnosti výsledků analýz syrového mléka

Věrohodnost výsledků referenčních a následně rutinních analýz složení a hygienické kvality mléka je nepochybně důležitá pro hospodářské účely. Jedná se o šlechtění zvířat a obchod s plemenným materiálem, stejně jako o poradenství k výživě a zdravotnímu stavu krav (individuální vzorky mléka v kontrole užítkovosti). Dále o řízení mlékařské technologie, proplácení kvality mléka a kvalitu mléčného potravinového řetězce (bazénové vzorky v kontrole kvality syrového mléka). Tato kvalita souvisí také s jeho bezpečností pro konzumenty. V praxi ovšem někdy vznikají sporné situace ohledně věrohodnosti výsledků z komerčního hlediska. Zde však objektivita techniky srovnávání případného výsledkového rozdílu není vždy 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, 1993), 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.

Z uvedených důvodů již dříve byla prováděna mezilaboratorní srovnání věrohodnosti výsledků mlékařských analýz s cílem upozornit na existující problémy (BUCHBERGER et al., 1971; MICHALAK, 1972; BIGGS, 1972, 1978; SHERBON, 1975; MICHALAK et al., 1978; GRAPPIN et al., 1980; BIGGS et al., 1984, 1987; VINES et al., 1986; VOORT VAN DE et al., 1987; COLEMAN a MOSS, 1989; BARBANO et al., 1991).

Nelze neuvést osobní zkušenost ohledně prvního (1996) internacionálního PT pod hlavičkou ICAR CECALAIT pro referenční metody stanovení základního složení mléka (tuk, bílkovina, laktóza, sušina tukuprostá). Byl proveden z důvodu signálů z odborných prací, že v analýzách existují nezdůvodnitelné disproporce. Konkrétně, pro obsah hrubých bílkovin bylo variační rozpětí mezi průměry zúčastněných referenčních laboratoří (asi 12 z celého světa) pro 10 vzorků mléka referenční sady celé tři desetiny procenta! Hodnota naší referenční laboratoře -0,03 % proto tehdy zdaleka zcela vyhovovala k úspěšnému splnění testu. Postupně, s následnými PT, během cca 5 let, došlo k výrazné redukci této výsledkové variability a tedy vzrůstu věrohodnosti výsledků analýz základního složení mléka referenčními metodami. Dnes je situace taková, že hodnota průměrné odchylky od referenční hodnoty $\pm 0,01$ % je na hraně přijatelnosti, kdy závisí na její variabilitě a variační rozpětí průměrů je obvykle do 0,08 %. Lapidárně lze pak konstatovat, že věrohodnost výsledků měření referenčních metod vzrostla nejméně desetkrát! Na základě této zkušenosti, ale i objektivních vyhodnocení (GOLC-TEGER 1996, 1997; GOLC-TEGER et al., 1996; HANUŠ et al., 1998, 2000, 2007 b, 2008 a, 2009; PITKÄLÄ et al., 2005), lze konstatovat, že zavedení (GRAPPIN, 1987, 1993; VALENBERG, 1990; LERAY, 1993, 2007, 2009; WOOD, 1994; WOOD et al., 1998) a rozšíření PT (mezilaboratorní testy výkonnosti a způsobilosti analytické práce = proficiency testing) na mezinárodní úrovni výrazně celosvětově přispělo k věrohodnosti mlékařských analytických výsledků pro dnešek.

Podpora kvality v mlékařských analytických systémech

Významným zlepšením mlékařského analytického systému v nedávné době (posledních 15 roků) bylo zavedení transportu vzorků mléka v plně kontrolovaném chladovém řetězci prostřednictvím skříňových (tepelně izolovaných) vozů vybavených kompresorem. Pro další vývoj zmíněných kvalitativních systémů je nezbytné provádět průběžně odhady různých interferenčních vlivů na spolehlivost měření. Na základě odhadů pak technicky nebo technologicky eliminovat významně negativní vlivy.

Neexistence zlatého standardu v mlékařských analýzách

V oboru analýz syrového mléka, vzhledem k jeho možné biochemické variabilitě s ohledem na faktory biologického druhu, sezónní vlivy, efekty výživy, krmení a zdravotního stavu zvířat, neexistuje něco, co známe z jiných oborů a to je zlatý standard. Tento lze v jiných analytických oborech spolehlivě uchovávat nezměněný po dlouhou dobu a používat

pro účely kalibrací nebo srovnávání k potvrzení správnosti výsledků analýz. Zmíněné patřičně komplikuje situaci v zajištění věrohodnosti výsledků analýz mléka. Navíc shora uvedené efekty přispívají k interferencím do vztahů mezi přímými (klasickými, referenčními, kalibračními) a nepřímými (rutinními, kalibrovanými) metodami mlékařských analýz (BIGGS, 1972, 1978; BIGGS et al., 1984, 1987; GRAPPIN et al., 1980, GRAPPIN, 1987, 1993; HANUŠ et al., 2007 b, 2008 a, 2009). Tato skutečnost situaci komplikuje ještě více. Proto musí být rutinní metody pravidelně kalibrovány. Situaci v tomto oboru z mezinárodního pohledu koordinuje více profesních organizací jako IDF, ICAR, AFEMA, APLAC atp. Pracovní analytické skupiny se zabývají výzkumem a vývojem mlékařských analytických postupů, řešením sporných metodických otázek a organizací výkonnostních testů analytické způsobilosti, zejména pro referenční postupy.

Mlékařský analytický systém a základní mléčné ukazatele

Aby výše uvedenou zakázku (BAUMGARTNER et al., 2000) mohly mlékařské laboratoře v České republice plnit, jsou převážně akreditovány podle mezinárodního standardu 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 povinny uvádět u svých výsledků.

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; LERAY, 1993; HANUŠ et al., 2000, 2007 b, 2008 a) 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 nezřídka 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 (HB); %); - 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⁻¹, mg.100ml⁻¹); - látkový obsah volných mastných kyselin (VMK; mmol.100g⁻¹ mléčného tuku, nebo mmol.kg⁻¹ mléka); - počet somatických buněk (PSB; 10³.ml⁻¹); - celkový počet mezofilních mikroorganismů (CPM; 10³CFU.ml⁻¹; 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⁻¹ roztoku NaOH); - aktivní kyselost (pH); - kysací schopnost (KS; hodnota jogurtového testu v jednotkách SH); - koncentrace kyseliny citrónové (KC; mmol.l⁻¹ nebo v %); - koncentrace acetonu (A; mg.l⁻¹); - počet koliformních bakterií (CFU.ml⁻¹); - počet psychrotrofních bakterií (10³CFU.ml⁻¹); - počet termorezistentních bakterií (10³CFU.ml⁻¹); - přítomnost anaerobních sporulujících mikroorganismů. Smluvně lze sledovat např. i syřitelnost a tak podobně.

Nejčastěji používané principy u rutinních mlékařských analýz

V mlékařských laboratořích (KALA et al., 2018, 2019) je již déle používána, pro určení obsahů hlavních složek mléka (především obsah tuku, bílkovin, laktózy ale i některé další složky), tzv. infraanalýza (IR). Existují různé konstrukce přístrojů na bázi IR optických filtrů (F) se specifickými vlnovými délkami pro jednotlivé mléčné komponenty, nebo na bázi celého IR spektra s vyhodnocením signálu pomocí Fourierových transformací (FT). V mlékařství jsou častější vlnové délky MIR (mid) než NIR (near) s vestavěným homogenizátorem v hydraulickém systému pro odstranění případného interferenčního vlivu optického rozptylu tukových kuliček v kyvetě přístroje. Pro tyto tzv. nepřímé metody je nezbytná periodická kalibrace prostřednictvím referenčních přímých analytických metod. V ČR je tento postup upraven již déle platnou a modifikovanou normou ČSN 57 0536 (jakkoliv platnost ČSN je dnes problematická). Protože se syrové mléko mění v závislosti na sezóně, resp. výživě krav, neexistuje žádný materiál na způsob „zlatého standardu“, jako v některých jiných chemických (jak již bylo uvedeno), ale zejména fyzikálních laboratořích. Jako „pevný bod v prostoru“ mohou za této situace posloužit pouze periodické výsledky internacionálního testování způsobilosti referenčních metod (např. ICAR-ACTILAIT, APLAC, MUVA nebo AMA-AFEMA), tzv. světové referenční průměry, po statistickém ošetření nejpravděpodobněji správné hodnoty. Daný fakt vyvolává i zhoršení vztahu referenční metoda × nepřímá metoda v čase a tím potřebu periodicity kalibrací nepřímých metod. Zde ovšem hraje ještě významnou roli celá řada praktických a teoretických specifik ve vztahu reference × nepřímá metoda, které nelze podrobně rozebírat v této práci. Norma ČSN 57 0536 určuje jednotlivé referenční metody a závaznou frekvenci kalibrace minimálně 1× za 3 měsíce. Neoficiálně se argumentuje technickou stabilitou infraanalyzátorů. Ta je nepochybná, existuje však řada dalších vlivů, jak bylo již zmíněno (např. sezónní variabilita nebílkovinných dusíkatých látek při kalibraci IR instrumentů na obsah hrubých bílkovin podle Kjeldahla nebo sezónní variabilita složení mléčného tuku z hlediska profilu mastných kyselin). Proto je tato argumentace poměrně zavádějící. Technickým vývojem je proto zmíněná norma dalece překonána a vyžaduje zásadní revizi, zejména s ohledem na požadavek frekvence kalibrací.

Kontrola kvality referenčních i rutinních výsledků chemických analýz v mlékařství ke kalibracím a ve výkonnostních testech v ČR

Akreditovaná referenční laboratoř pro syrové mléko (RL-SM) VÚM (Výzkumný ústav mlékárenský) Praha je pro kontrolu svých výsledků napojena svými referenčními metodami

na mezinárodní výkonnostní testy ICAR-ACTILAIT (syrové mléko, chemické a mikrobiologické zkoušky) a MUVA Kempten (Labor- und Dienstleistungszentrum, složky syrového mléka). Z titulu své funkce pak RL-SM sama organizuje a provádí přípravu a pravidelné rozesílání sad referenčních standardů (obsah tuku (T), hrubých bílkovin (HB), kaseinu (K), monohydrátu laktózy (L), sušiny tukuprosté (STP) a koncentrace kyseliny citronové (C)) pro kalibrace nepřímých mlékařských metod (převážně infraanalýza) a dále výkonnostní testování na národní úrovni (T, HB, L, STP, kasein, koncentrace močoviny (M), bod mrznutí mléka (BMM) a volné mastné kyseliny v mléčném tuku (VMK)). Kalibrace jsou prováděny v měsíčních intervalech, což bylo odvozeno na základě výzkumně-vývojových a praktických zkušeností (HANUŠ et al., 2005, 2006). Výkonnostní testy pak měsíčně pro T, HB, L a čtvrtletně pro kasein, STP, M a BMM. V našem systému, resp. pracovní síti v ČR, tak existují referenční (REL) laboratoř (přímé metody) a rutinní (RUL) laboratoře (nepřímé metody). Pochopitelně, pro jednotlivé zkoušky mohou být jiné REL. Jak kalibrace, tak výkonnostní testy (pro T, HB, L, K, STP, M, i BMM) jsou RL-SM konvenčně prováděny na škále desíti vzorků mléka s relevantními variačními obory. Výjimkou je pouze výkonnostní test pro BMM, který je kromě desíti mléčných vzorků souběžně prováděn také na dvou vodných roztocích NaCl. Zmíněné variační obory referenčních nebo kontrolních sad vzorků jsou přibližně: T 2 až 3 % (od 2 do 5 %); HB 0,5 až 0,8 % (od 2,8 do 3,6 %); K 0,5 až 0,8 % (od 2,2 do 3,0 %); L 0,5 až 0,8 % (od 4,4 do 5,2 %); STP 0,7 až 1,5 % (od 8,0 do 9,5 %).

Současný stupeň vývoje systému v RL-SM vedl ke stavu (HANUŠ et al., 2007 b, 2008 a, 2009), že kalibrace (pro infraanalyzátory MIR a MIR-FT) a případně výkonnostní testy jsou prováděny měsíčně pro syrové kravské mléko (T, HB, L, STP, K). Dvakrát ročně pak pro syrové ovčí a kozí mléko (T, HB, L; GRAPPIN, 1987; HANUŠ et al., 1996). Konečně čtvrtletně nebo podle požadavku pro mléčné produkty (T, HB, L) jako pasterované mléko, odstředěné mléko, sladká syrovátka řídká, sladká syrovátka hustá, (T) smetana hustá a smetana řídká, případně speciální mléčné sýrařské kompozice (T, HB, L).

Produkce vlastních referenčních materiálů v RL-SM

Referenční vzorkové sady jsou za použití specifických postupů pro získání potřebných variačních oborů pravidelně připravovány pro následující materiály: - syrové mléko kravské; - syrové mléko ovčí; - syrové mléko kozí; - pasterované mléko kravské; - odstředěné mléko; - smetana do 20 % tuku; - smetana 20 až 45 % tuku (nebo smetana celkem); - syrovátka tekutá; - syrovátka zahuštěná. Tab. 1 shrnuje jednotlivé přibližné variační obory v požadovaných složkách (T, B, L, STP a K) pro uvedené materiály. V referenční vzorkové sadě je 8, většinou však 10 vzorků, referenčních standardů. Vzorky jsou relevantně ošetřeny, konzervovány (KROGER, 1985; BENDA, 1995; HANUŠ et al., 1992 a, b; GENČUROVÁ et al., 1993 a, b, 1994), vychlazeny a odeslány v termoboxech do cílových laboratoří (HANUŠ a ŽVÁČKOVÁ, 1989; SOJKOVÁ et al., 2009).

Pro základní mléčné složky (T, B, L, STP, K) je kalibrační a kontrolní systém založen na několika následujících zásadách a principech, zejména na:

- desíti kalibračních mléčných standardech v sadě;
- měsíční frekvenci opakování;
- anonymním klíči pro opakovatelnost výsledků při přípravě referenční sady standardů;
- rychlém odeslání standardů v chladových podmínkách;
- dostatečném oboru rozptylu hodnot pro vzorky v sadě pro všechny analyzované složky (obsahy tuku, bílkovin a laktózy, T, B, L, STP a K);
- validaci referenčních výsledků před jejich vyhlášením pro kalibraci prostřednictvím sofistikovaného posouzení vztahu referenční a rutinní (IR) metody;

- využití prvních rutinních výsledků kalibračních měření pro vyhodnocení výkonnostního testování analytické způsobilosti;
- možnosti diagnostického využití sumarizovaných, utříděných a graficky zobrazených výsledků výkonnostního testování ve smyslu indikace a specifikace případných výsledkových neshod.

Tab. 1 Referenční vzorkové sady produkované pro různé materiály s variačními obory složek v RL-SM.

Materiál	Variační obor referenční sady vzorků, %				
	T	B	L	STP	K
syrové mléko kravské	1,65 – 5,95	2,48 – 3,89	3,79 – 5,30	7,21 – 9,49	2,04 – 3,18
syrové mléko ovčí	1,34 – 13,18	4,67 – 7,47	3,63 – 5,16		
syrové mléko kozi	2,15 – 7,40	2,69 – 4,40	3,42 – 5,10		
pasterované k.m.	0,75 – 5,40	2,10 – 3,60	3,52 – 5,10	6,71 – 9,22	9,97 – 13,62 S
odstředěné k.m.	0 – 0,39	1,77 – 3,62	2,52 – 5,26	4,82 – 9,43	5,16 – 9,46 S
smetana k.m.	6,03 – 42,5	1,63 – 3,10	2,54 – 4,09	3,58 – 8,50	
podmáslí k.m.	0,30 – 0,75			4,47 – 8,17 S	
syrovátka tekutá k.m.	0,01 – 0,37	0,50 – 2,05	2,80 – 13,47		
k.m. syrov. zahuštěná	0,24 – 1,06	1,47 – 4,98	9,00 – 29,32		

STP sušina tukuprostá; K kasein; S sušina celková; k.m. kravské mléko.

Výkonnostní testování ve vazbě na kalibraci – specifita mlékařských analýz

Obecně se v mlékařských analytických postupech používá ke kalibraci (z důvodu existence četných interferenčních efektů na vztah přímé (referenční) a nepřímé metody) sada více vzorků (nejčastěji desíti nebo šesti), jen výjimečně vzorek jeden, nebo dva. Podobně to platí pro metody výkonnostního testování analytické způsobilosti. Z hlediska výkonnostního testování má být zaznamenán úspěch pro metodu v laboratoři ve výkonnostním testu alespoň jedenkrát za auditem sledované období. V mlékařské analytice umožňují výsledky prvních měření sad stejných vzorků mléka všemi přístroji v síti na stávajících kalibračních hladinách také současně při kalibračním procesu vyhodnocení v rámci testování analytické způsobilosti. Měsíční kalibrační interval tak zároveň umožňuje odpovídající počet testů analytické způsobilosti. Při vzniku výsledkové neshody v testu má pak laboratoř častěji k dispozici objektivní kontrolu své práce a může tuto neshodu dříve napravit. Při neúspěchu v méně frekventních testech (1× až 2× ročně) se hůře zajišťuje náprava. Při vyšší frekvenci aplikace kalibrace a výkonnostních testů současně proto může laboratoř snadněji získat dokument o nápravě výskytu neshody, což zvyšuje provozní jistotu managementu mlékařských laboratoří.

Výkonnostní testování analytické způsobilosti mlékařských laboratoří

V mléčných laboratořích jsou pro hodnocení testů způsobilosti nejčastěji používány systémy:

- Euklidická vzdálenost (E; LERAY, 1993; HANUŠ et al., 2000, 2004, 2007 b, 2008 a, 2009; ICAR testy a národní testy RL-SM pro T, HB, L, M a BMM) od počátku (výhodou je dvourozměrný rozklad výsledkové neshody na systematický a náhodný zdroj chyby a design přednostně uzpůsobený více-vzorkovým mlékařským testům), jako zřejmě nejlepší způsob vyhodnocení, kde tabulkové vyjádření poskytuje řazení účastníků podle věrohodnosti dosažených výsledků;
- Youden plot, používaný v testech AFEMA (FUCHS, 2000) uzpůsobený pro dvou-vzorkové designy testů (výhoda zdrojového rozkladu výsledkové neshody);
- Z-score (WOOD, 1994, 1998; COVENEY, 2001; národní testy RL-SM pro BMM) pro jedno-, dvou- i více-vzorkové designy testů (neposkytuje výhodu zdrojového rozkladu výsledkové neshody).

Často se v mlékařských výkonnostních testech uplatňuje také vyčíslení, resp. zobrazení recovery pro speciálně vybrané nebo připravené vzorky z kontrolní sady. Např. při analýzách obsahu dusíku ve známých koncentracích roztoků aminokyselin jako glycin nebo tryptofan pro kontrolu analýzy podle Kjeldahla (jako ICAR-CECALAIT) nebo močoviny v mléce (jako RL-SM). Uvedené umožňuje lepší orientaci při vyhodnocování testů v mezních situacích, když by distribuce hodnot použité pro odvození referenčních hodnot vzorků v testu podlehly nějaké náhodné anomálii, třeba v situaci nižšího počtu účastníků. Často jsou např. v mléce pro multikomponentnost mléčné matrice problémem přípravy nulových standardů pro kalibrované metody. Příkladem může být většina mléčných složek, zejména močovina. Proto má zavedení určení recovery v mléčných testech zvláštní význam.

Vlastním problémem je stanovení diskriminačních limitů výkonnostních testů. I když existují statistické konvence (testy odlehlosti a Z-score na hladině pravděpodobnosti 5 %), přesto některé postupy jsou specifické (ICAR-CECALAIT (ACTILAIT)) a vyřazují účastníky testů mnohem přísněji. Derivace diskriminačních limitů tak nejsou zdaleka jednotné. Dlouhodobým porovnáním některých používaných systémů byly nalezeny následující výsledky pro vyřazování účastníků: ICAR (referenční metody): pro T 34,7±9,8 % (dříve 56,9±8,5 %), pro HB 41,6±10,1 % (dříve 56,1±8,1 %), pro L 19,4±8,1 % (dříve 39,7±13,7 %), pro M 36,3±9,2 %; APLAC (referenční metody, sušené mléko) pro vlhkost 15,4 %, pro obsah popela 12,6 %, pro T 23,5 %, pro HB 12,5 %) různé analýzy 8,0±9,8 %; AFEMA (referenční analýzy mléka) 7,2±5,0 %; RL-SM (rutinní analýzy mléka) pro T 24,0±5,7 %, pro HB 18,1±8,3 %, pro L 18,0±8,8 %, pro M 16,1±11,8 % a pro BMM 25,0 % (HANUŠ et al., 2006). Jsou zřejmě výraznější rozdíly v diskriminaci výsledků. Pro zdravou praktickou motivaci účastníků, pro reálné přijímání praktických opatření k řešení výsledkových neshod, vedení jejich evidence a účinné průběžné zlepšování výsledků laboratorní sítě lze ovšem na základě empirie za optimální považovat hodnoty diskriminace max. do 15 %. Je zcela jistě problematická diskriminace na úrovni např. 50 % (ale již > 30 %; uvedené v podstatě paralyzuje síť i důvěryhodnost testu), když např. nevyhovující odchylka HB od středu je již na úrovni $d > \pm 0,03$ %, což znamená relativní analytickou chybu na úrovni pouze 1 %.

Testování analytické způsobilosti rutinních mlékařských laboratoří v ČR

Výkonnostní testování RL-SM na národní úrovni je důležitou součástí kontroly a řízení kvality mlékařských analýz. Uvedené se provádí pomocí tzv. kruhových (hvězdicových) testů, tzn. testování analytické způsobilosti (proficiency testing). Ty podléhají určité časové frekvenci. Např. v ČR u RL-SM jako organizátora je to jeden kalendářní měsíc pro obsahy T, B a L v mléce (MIR-F a MIR-FT) a tři měsíce pro M (různé metody jako Ureakvant, MIR-FT, fotometrické metody), PSB (počet somatických buněk; fluoro-opto-elektronická metoda vyšetření ve filmu na rotujícím disku a ve variantě průtočné cytometrie) a BMM (kryoskopicky a screeningově s MIR-FT v kombinaci s konduktivitním čidlem). Počet vzorků

v referenční sadě je vždy 10 (Tab. 2), tyto jsou náležitě ošetřeny, konzervovány (ARDÖ, 1979; bronopol 0,02 %, tablety DF Microtabs; KROGER, 1985), vychlazeny a odeslány v termoboxech (≤ 10 °C) do cílových laboratoří (HANUŠ a ŽVÁČKOVÁ, 1989; SOJKOVÁ et al., 2009). Z výsledků měření je vyhodnocena Euklidická vzdálenost (ED) od počátku pro seřazení laboratoří a posouzení úspěšnosti v testu. U BMM je pak ještě proveden test kryoskopického stanovení na dvou vzorcích definovaného roztoku NaCl s BMM v oboru reálného mléka. Je určen režim měření kryoskopu (plato search mode) a výsledky jsou vyhodnoceny pomocí Z-score (COVENEY, 2001; WOOD, 1994; WOOD et al., 1998). Obecně ovšem, nejen proto, že Euklidická vzdálenost (ED) je ukazatel souřadnicovou povahou dvourozměrný (d a sd) narozdíl od Z-score, umožňující odhad směrem ke stupni systematické chyby, ale rovněž proto, že lze také jeho dva rozměry odečítat v původních jednotkách ukazatele (ED není standardizována jako Z-score) a dovoluje tak učinit si bezprostředně praktickou představu a rozsahu posunu vzhledem k vlastním hodnotám konkrétního ukazatele, je efektivnějším ukazatelem kvality prováděných analýz oproti Z-score, zejména u vícevzorkových mlékařských výkonnostních testů (PT; proficiency testing).

Tab. 2 Sady vzorků pro výkonnostní testování (PT) analytické způsobilosti v mlékařských laboratořích připravované s variačními obory složek v RL-SM.

Složka nebo vlastnost mléka pro výkonnostní testování	Variační obor sady vzorků
Tuk	1,65 – 5,95 %
Bílkoviny	2,48 – 3,89 %
Laktóza	3,79 – 5,30 %
Močovina	5,60 – 75,70 mg.100ml ⁻¹
Bod mrznutí mléka	- 0,5480 až -0,4687 °C

Syrové mléko kravské (nativní a některé vzorky s umělejšími manipulacemi k rozšíření variačního oboru).

Vývoj hluboce zamražených pilotních vzorků mléka pro kontrolu stability infraanalýzy

Podstatnou částí měření složek syrového mléka je nepřímá analýza na základě měření infračerveného spektra. Pro toto měření slouží ke krátkodobé stabilizaci a úchově vzorků mléka nějaký druh chemické konzervace (BUCHBERGER a KIERMEIER, 1975; WEAVER, et al., 1977; ARDÖ, 1979; NG-KWAI-HANG a HAYES, 1982; PETTIPHER et al., 1982; RAPP a MÜNCH, 1984; SJAUNJA, 1984 a, b, c; SJAUNJA et al., 1984; SJAUNJA a ANDERSSON, 1985; KROGER, 1985), k dlouhodobé úchově pak může být testováno hluboké zamražení (BAUMGARTNER a LANDGRAF, 2004). Hluboké zmrazení vzorků mléka pro účely pilotních vzorků je však jednak technologicky náročnější, než prostá chemická konzervace, a zejména náročné na kvalitu mléka, má-li proběhnout bezproblémově s udržením stability pilotů. V RL-SM byl hodnocen test postupu přípravy tzv. pilotních vzorků mléka (hluboce zamražených (BAUMGARTNER a LANDGRAF, 2004)) pro dlouhodobou kontrolu stability metod měření složení mléka (HANUŠ et al., 2008 b; HERING et al., 2008), popřípadě vzorků se složkovými manipulacemi (HANUŠ et al., 2003, 2011). Hluboké zmrazování pilotních vzorků by mělo zajistit jejich mikrobiologickou kvalitu. Nemělo by dojít k většímu buněčnému a makromolekulárnímu poškození mléčných složek. Rychlé hluboké zmrazení by nemělo umožnit tvorbu větších krystalů v mléce. Zvýšení stability a dlouhověkosti pilotních vzorků zlepšuje věrohodnost výsledků měření. Pilotní vzorky mléka byly zamrazeny v tekutém dusíku -196 °C a poté uloženy při -21 °C po jeden měsíc (A) a více měsíců (BP) do opakované MIR analýzy (T, B, L, STP) a instrumentální analýzy M a PSB (HANUŠ et al., 2008 b; HERING et al., 2008).

Vliv zamražení pilotních vzorků (A) byl poměrně malý, v podstatě v rámci hodnoty povolené opakovatelnosti ($\pm 0,02$ %) pro složkové ukazatele. Mírně byl vyšší u tuku u vzorku plemene Jersey (J) a vyšší byl u PSB u vzorků plemene Holštýn (H). Stabilita hodnot zamražených pilotních vzorků (freezing pilot samples, FPSs) podle směrodatných odchylek pro důležité

hodnocení T byla lepší pro vzorky plemene H. U ostatních složkových ukazatelů byla opakovatelnost hodnot FPSs velmi dobrá. U PSB byla opakovatelnost lepší u FPSs plemene J ($\pm 16,5 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$). Větší variabilitu ($\pm 30,1 \cdot 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$) u vzorku H tak lze hodnotit méně skepticky. Nebyly pozorovatelné zjevné trendy výsledků ve vývoji opakovatelnosti v FPSs. Mírný trend byl pouze u bílkovin, kde pokrýval velmi malý obor kolísání. Kontrola mlékařských měření v režimu pokusu A je proto prakticky použitelná.

V dlouhodobém (BP) pokusu byly oscilace hodnot zřetelně větší. Výsledky byly tedy horší. Průběhy většiny složkových křivek se však jeví jako přijatelné. Hodnoty opakovatelnosti (směrodatné odchylky) FPSs byly převážně nižší než $\pm 0,06 \%$, což je dobře přijatelné pro shodu výsledků nepřímé metody s referenční metodou. Pohybovaly se od $\pm 0,025 \%$ pro L do $\pm 0,059 \%$ pro T (u plemene J) s výjimkou B $\pm 0,085 \%$ u vzorku plemene J. I postup BP se ukázal, vzor určitým výkyvům v průběhu časových křivek, jako použitelný pro kontrolu stability měření přístrojů v rutinních laboratořích pro testování složení mléka v půlroční periodě uložení. V praktickém použití však slouží jedna referenční hodnota pro daný FPS od kalibrace ke kalibraci (měsíc). Nějaký setrvalý trend v opakovatelnosti měření FPSs může indikovat neadekvátní přístrojový drift ve výsledcích.

2) Cíle certifikované metodiky

Výzkumná a vývojová činnost v oboru mlékařských analytických metod a v oblasti vyhodnocování jejich výkonnostní způsobilosti, stejně jako vývoj diagnostických grafických metod k identifikaci a specifikaci původu případných výsledkových neshod nepochybně přispívá významně k objektivitě posuzování kvality syrového mléka a tím nepřímo podporuje kvalitu a bezpečnost mléčného potravinového řetězce a zdravotní stav populace spotřebitelů mléčných výrobků.

Cílem certifikované metodiky je vyvinout postup přípravy mléčných referenčních standardů s ohledem na základní složení pro hluboké zmrazení a dlouhodobé uložení k účelům použití ve výkonnostním testování analytické způsobilosti při tvorbě referenčních hodnot jako statisticky očištěných středních hodnot nepřímých metod s potřebnými vlastnostmi časové stability a zejména s relevantní a reprezentativní variabilitou hodnot pro příslušné podmínky mlékařského prostředí.

Tato validace metodického postupu přípravy zmrazených mléčných standardů pro výkonnostní testování analytické způsobilosti doplňuje systematicky a metodicky návaznosti z předešlého vývoje metod kontroly věrohodnosti mlékařských analýz prostřednictvím předchozích relevantních certifikovaných metodik: QF 3019 UM 1 (2006 a); QF 3019 UM 2 (2006 b); MSM 2678846201 UM 4 (2008 c); QF 3019 UM 5 (2008 d); QJ1510339 RO1418 CM 37 (2018).

3) Vlastní vývoj pro certifikovanou metodiku – testování postupů a metod, validace dat přípravy sady základního složení mléčných standardů pro proficiency testing

I) Modelový testovací soubor na bázi individuálních vzorků mléka

Byly odebrány individuální vzorky mléka ($n = 10$) ve stádě převážně českého strakatého skotu (C85H15) během pravidelné kontroly užitkovosti (KU) ve vazné stáji s potrubním dojicím zařízením poloautomatického charakteru MobilMatic. Stáj se nachází v Pardubickém kraji v nadmořské výšce 475 m. Mléčná užitkovost dojníc daného stáda v kontrolním roce

2017-2018 činila: ve 101 uzavřené laktaci 8 386 kg mléka, průměrná tučnost 3,94 %, tj. 331 kg tuku, průměrný obsah bílkovin 3,56 %, tj. 298 kg bílkovin. Distribuce odebraných vzorků po laktační křivce, aby charakterizovaly celou laktaci s jejími efekty na složení mléka, byla tak, že 4 vzorky byly od dojníc do 100 dnů laktace, 3 od dojníc mezi 101 až 200 dnů laktace a 3 vzorky nad 200 dnů laktace.

Tento odběrový design měl také zajistit potřebnou variabilitu hodnot mléčných složek, za kterou podle materiálů zmíněných výše a s přihlédnutím k nim pro daný účel, lze kvalifikovaným odhadem považovat cca: tuk 2,90 až 5,00 %; hrubé bílkoviny 3,00 až 3,70 %; monohydrát laktózy 4,60 až 5,00 %. Uvedené hodnoty by měly zajistit korektní mezilaboratorní (mezipřístrojové) srovnání výsledků při použití adekvátních statistických metod (stanovení Z-score nebo Euklidické distance pro řazení výsledků podle úspěšnosti účasti v testu (HANUŠ et al., 2007 b, 2008 a)). Bylo odebráno 5 l mléka od jedné dojnice jako vzorek během KU, prováděno chlazení (< 10 °C) a transport a po míchání distribuce do malých plastových vzorkovnic (30 ml) v potřebném množství. Tyto vzorkovnice byly zamrazeny v tekutém dusíku (-196 °C) a uloženy v mrazničce (-30 °C) do analýzy (BAUMGARTNER a LANDGRAF, 2005; HANUŠ et al., 2008 b, c). Pak byly sady vzorků analyzovány na relevantně kalibrovaném infraanalýzátoru mléka Bentley DairySpec (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA) podle operačního manuálu opakovaně na základní složení mléka. Ve výsledcích byla kontrolována opakovatelnost hodnot hlavních složek mléka (příloha 1, primární data).

Výsledky ukázaly dobrou opakovatelnost hodnot při měření vzorků 8 týdnů po zamražení pro všechny složky mléka u 5 vzorků. Dva vzorky nebyly po revitalizaci v dobré kondici a nebyly proto měřeny. 8 vzorků vykazovalo následující výsledky:

- variační rozpětí činilo od 2,50 do 4,66 % pro tuk (2,16 % absolutně a 57,0 % relativně (ve vztahu ke střední hodnotě sady vzorků)), od 3,17 do 4,77 % pro hrubé bílkoviny (1,6 % absolutně a 42,0 % relativně) a od 4,48 do 5,06 % pro monohydrát laktózy (0,58 % absolutně a 12,4 % relativně);

- průměry a směrodatné odchylky sady vzorků byly $3,79 \pm 0,76$ % pro tuk (variační koeficient 20,1 %), $3,81 \pm 0,5$ % pro hrubé bílkoviny ($v_x = 13,1$ %) a $4,69 \pm 0,19$ % pro laktózu ($v_x = 4,1$ %);

- opakovatelnost duplicitních měření vzorků činila $\pm 0,0085$ % pro tuk absolutně a $\pm 0,23$ % relativně (ve vztahu ke střední hodnotě sady vzorků), $\pm 0,0057$ % pro hrubé bílkoviny absolutně a $\pm 0,15$ % relativně a $\pm 0,0048$ % pro laktózu absolutně a $\pm 0,1$ % relativně. Směrodatná odchylka opakovatelnosti nepřímého měření základních složek mléka (pro infračervenou analýzu) byla dříve standardně limitována jako maximálně $\pm 0,02$ % absolutně (ČSN 57 0536) a nyní jako maximálně $\pm 0,014$ % (ČSN ISO 8196-1, ČSN ISO 8196-2 a ČSN ISO 8196-3). Je proto zřejmé, že tento parametr byl u všech sledovaných složek splněn se značnou rezervou.

Celkově, hodnoty variačního rozpětí, střední hodnoty a míry variability testované vzorkové sady přibližně odpovídaly potřebám kalibrací nepřímých mlékařských analytických metod, resp. potřebám výkonnostního testování analytické způsobilosti a kontroly věrohodnosti výsledků, podobně jako zejména hodnoty opakovatelnosti měření, při srovnání k referenčním standardům obsaženým ve výsledcích prací v seznamu přiložených relevantních literárních zdrojů.

Pět kondičně dobrých vzorků (konzistence a homogenita aspektů) bylo měřeno ještě za týden, opět s dobrými výsledky opakování hodnot hlavních složek mléka. Došlo tedy k rozpadu a ztrátě opakovatelnosti měření některých vzorků ($n = 5$ (2 neměřené + 3 vyřazené pro následný termín měření pro zhoršenou opakovatelnost hodnot již v prvním měření)) mléka. Ostatní vzorky ($n = 5$) byly při dobré opakovatelnosti měřeny opakovaně (uložení 9 týdnů). První měření pěti vybraných rozpuštěných rehomogenizovaných vzorků, rozeslaných případně do laboratoří, by splnilo účely PT. Rozeslání a měření všech testovaných vzorků v rámci PT by však již bylo problematické.

Tento výsledek testu nelze proto hodnotit jako úspěšný, neboť byla očekávána delší doba udržitelnosti materiálu při daném způsobu ošetření pro úsporu nákladů při takovéto kontrole analytické způsobilosti mléčných laboratoří.

Ukázala se potřeba pozměnit způsob přípravy mléčných standardů pro hluboké zamražení s odpovídající variabilitou složek. Protože individuální mléko bylo odebráno teplé ve větším objemu, použitý způsob chlazení při transportu patrně technicky nesplnil svůj účel rychlého zchlazení. Dále individuální mléko mohlo podléhat vlivu subklinických mastitid v některých případech ve zvýšené míře a také mléko krav ke konci laktace, s možnými fyziologickými změnami, mohlo být příčinou rozpadu některých hluboce zmražených a uložených vzorků.

Ukázala se potřeba brát vzorky mléka bazénového, které reprezentuje celou laktaci, mléko mastitidně a jinak podezřelých krav je obvykle vyloučeno při dojení, mléko z prvních 200 dnů laktace tvoří zastoupením obvykle minimálně tři čtvrtiny objemu (nad 200 dní jen čtvrtinu objemu a méně) a je po dojení chladicím systémem rychle zchlazeno pod 6 °C. Zde jsou rizika s ohledem na chyby v analytickém složení lépe kontrolována. Zde je však právě problém se získáním potřebné variability hodnot. Proto je nezbytné zařadit bazénové mléko více plemen (Czech Fleckvieh, Holstein, Jersey) a přispět k získání variability v sadě vzorků modifikacemi některých vzorků s ohledem zejména na složení tuku, které však mírně upravuje i složení bílkovin a laktózy (HANUŠ et al., 2003, 2008 d, 2010, 2011). Jedná se o sedimentační frakcionaci mléka k získání nízkých a vysokých hodnot tuku. Také malý přídavek vody do 10 % objemu v jednom vzorku mléka sady pro redukci hodnoty zejména laktózy se jeví jako účelný.

II) Modelový testovací soubor na bázi bazénových vzorků mléka

Vývoj kontroly složení a kvality mléka, k tomu určených analytických metod a relevantních metod kontroly kvality měřených výsledků je stále velmi důležitý (BAUMGARTNER et al., 2000; MILLÁN-VERDÚ et al., 2003; MARTÍNEZ de la VARA et al., 2018). Protože, jak již bylo uvedeno, hluboké zmražení vzorků mléka pro účely pilotních vzorků je technologicky náročnější, než prostá chemická konzervace, a zejména je náročné na kvalitu mléka, má-li proběhnout bezproblémově s udržení stability pilotů, byly pro další postup použity bazénové vzorky mléka z výše uvedených důvodů.

Byly odebrány bazénové vzorky mléka ($n = 10$; příloha 2) v chovech J, H a C (podle plemen, Jersey, Holštýn a České starakaté) v nadmořské výšce v intervalu od 417 do 440 m. Bazénové mléko bylo z ranního a večerního nádoje u chovů J a H a jen z ranního nádoje u chovu C. Jako charakteristiky chovů jsou uvedeny výsledky kontrolního roku 2017 – 2018 kontroly mléčné užitkovosti v Tab. 3. Vzorky byly odebírány jako vychlazené, nekonzervované, a tak i transportovány (< 8 °C) do laboratoře k přípravě kontrolní sady standardů.

Tab. 3 Výsledky kontrolního roku 2017 – 2018 vzorkovaných chovů z kontroly mléčné užitkovosti.

Ukazatel	Uzavřená laktace	Mléko za normovanou laktaci	Průměr tuku za normovanou laktaci (305 dní)	Tuk za normovanou laktaci	Průměr hrubých bílkovin za normovanou laktaci	Hrubé bílkoviny za normovanou laktaci
Jednotka	počet	kg	%	kg	%	kg
J	170	5 210	5,41	282	4,35	227
H	395	9 708	3,99	388	3,51	341
C	79	8 022	3,91	314	3,55	285

J = Jersey; H= Holštýn; C = České strakaté.

Tyto odebrané vzorky mléka (n = 10) byly z hlediska základního složení některé ponechány v původní skladbě (n = 3) a jiné (n = 7) modifikovány rámcově podle postupu, který je obsažen v následující kapitole (III). Pak byly sady vzorků analyzovány na infraanalyzátoru mléka Bentley DairySpec (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA) podle operačního manuálu opakovaně. Kalibrační nastavení přístroje nebylo měněno během provádění validace postupu, což je významné zejména pro tento typ experimentu. Výsledky měření byly následující:

- pro původní (nativní) a modifikované, ale nemražené vzorky syrového mléka, před zamražením (Tab. 4):

- variační rozpětí činilo od 3,05 do 5,665 % pro tuk (2,615 % absolutně a 63,1 % relativně (ve vztahu ke střední hodnotě sady vzorků)), od 3,24 do 4,235 % pro hrubé bílkoviny (0,995 % absolutně a 26,8 % relativně) a od 4,17 do 4,70 % pro monohydrát laktózy (0,53 % absolutně a 11,7 % relativně);

- průměry a směrodatné odchylky sady vzorků byly $4,14 \pm 0,78$ % pro tuk (variační koeficient 18,8 %), $3,72 \pm 0,28$ % pro hrubé bílkoviny ($v_x = 7,5$ %) a $4,53 \pm 0,2$ % pro laktózu ($v_x = 4,3$ %);

- opakovatelnost duplicitních měření vzorků činila $\pm 0,005$ % pro tuk absolutně a $\pm 0,12$ % relativně (ve vztahu ke střední hodnotě sady vzorků), $\pm 0,0032$ % pro hrubé bílkoviny absolutně a $\pm 0,09$ % relativně a $\pm 0,0032$ % pro laktózu absolutně a $\pm 0,07$ % relativně. Směrodatná odchylka opakovatelnosti nepřímého měření základních složek mléka (pro infračervenou analýzu) byla dříve standardně limitována jako maximálně $\pm 0,02$ % absolutně (ČSN 57 0536) a nyní jako maximálně $\pm 0,014$ % (ČSN ISO 8196-1, ČSN ISO 8196-2 a ČSN ISO 8196-3). Je proto zřejmé, že tento parametr byl u všech sledovaných složek splněn se značnou rezervou;

- výsledky poukazují na dobrou kvalitu a vhodnost sady vzorků mléčných standardů pro daný účel přípravy kontroly analytické způsobilosti nepřímých instrumentálních měření v mlékařství a tím i na vhodnost použitého postupu přípravy;

Tab. 4 Výsledky sady mléčných standardů pro původní (nativní) a modifikované, ale nemražené vzorky syrového mléka, před zamražením.

Ukazatel	Tuk	Hrubé bílkoviny	Monohydrát laktózy	Sušina celková	Močovina
jednotka	%	%	%	%	mg/100ml
a	1	1	1	1	1
b	2	2	2	2	2
n	10	10	10	10	10
x	4,144	3,716	4,525	13,286	25,07
sx	0,78	0,28	0,195	1,176	3,542
vx (%)	18,8	7,5	4,3	8,9	14,1
min	3,05	3,24	4,17	11,54	19,0
max	5,665	4,235	4,7	15,445	31,3
m	3,998	3,673	4,61	13,17	25,125
rea	0,005	0,003162	0,003162	0,00922	0,191703
rer (%)	0,1207	0,0851	0,0699	0,0694	0,7647

a = počet vzorkovnic jednoho vzorku mléka; b = počet měření ze vzorkovnice vzorku mléka; n = počet vzorků mléka v sadě; x = aritmetický průměr; sx = směrodatná odchylka; vx = variační koeficient v %; min = minimum; max = maximum; m = medián; rea = opakovatelnost výsledků měření absolutně; rer = opakovatelnost relativně v %; % = g/100g.

- pro zamražené (uchování při -30 °C) a pak rozmražené a rehomogenizované vzorky mléka:

1. měření sady vzorků po rozmražení po 10 dnech úchovy (Tab. 5):

- variační rozpětí činilo od 3,03 do 5,655 % pro tuk (2,625 % absolutně a 63,6 % relativně (ve vztahu ke střední hodnotě sady vzorků)), od 3,25 do 4,26 % pro hrubé bílkoviny (1,01 % absolutně a 27,1 % relativně) a od 4,17 do 4,705 % pro monohydrát laktózy (0,535 % absolutně a 11,8 % relativně);

- průměry a směrodatné odchylky sady vzorků byly 4,13±0,76 % pro tuk (variační koeficient 18,3 %), 3,73±0,28 % pro hrubé bílkoviny (vx = 7,4 %) a 4,53±0,19 % pro laktózu (vx = 4,2 %);

- opakovatelnost duplicitních měření vzorků činila ±0,0045 % pro tuk absolutně a ±0,11 % relativně (ve vztahu ke střední hodnotě sady vzorků), ±0,0035 % pro hrubé bílkoviny absolutně a ±0,09 % relativně a ±0,0032 % pro laktózu absolutně a ±0,07 % relativně. Směrodatná odchylka opakovatelnosti nepřímého měření základních složek mléka (pro infračervenou analýzu) byla dříve standardně limitována jako maximálně ±0,02 % absolutně (ČSN 57 0536) a nyní jako maximálně ±0,014 % (ČSN ISO 8196-1, ČSN ISO 8196-2 a ČSN ISO 8196-3). Je proto zřejmé, že tento parametr byl u všech sledovaných složek splněn se značnou rezervou;

- výsledky poukazují na dobrou kvalitu a vhodnost sady vzorků mléčných standardů pro daný účel přípravy kontroly analytické způsobilosti nepřímých instrumentálních měření v mlékařství a tím i na vhodnost použitého postupu přípravy;

Tab. 5 Výsledky sady mléčných standardů pro původní (nativní) a modifikované, ale nemražené vzorky syrového mléka, před zamražením.

Ukazatel	Tuk	Hrubé bílkoviny	Monohydrát laktózy	Sušina celková	Močovina
jednotka	%	%	%	%	mg/100ml
a	2	2	2	2	2
b	2	2	2	2	2
n	10	10	10	10	10
x	4,13	3,729	4,525	13,291	24,355
sx	0,757	0,276	0,191	1,151	3,393
vx (%)	18,3	7,4	4,2	8,7	13,9
min	3,03	3,25	4,17	11,55	18,95
max	5,655	4,26	4,705	15,46	30,45
m	3,975	3,683	4,61	13,178	24,15
rea	0,004472	0,003536	0,003162	0,009747	0,345688
rer (%)	0,1083	0,0948	0,0699	0,0733	1,4194

2. měření sady vzorků po rozmražení po 21 dnech úchovy (Tab. 6):

- variační rozpětí činilo od 3,06 do 5,65 % pro tuk (2,59 % absolutně a 62,5 % relativně (ve vztahu ke střední hodnotě sady vzorků)), od 3,27 do 4,28 % pro hrubé bílkoviny (1,01 % absolutně a 27,0 % relativně) a od 4,17 do 4,71 % pro monohydrát laktózy (0,54 % absolutně a 11,9 % relativně);

- průměry a směrodatné odchylky sady vzorků byly $4,15 \pm 0,75$ % pro tuk (variační koeficient 18,2 %), $3,75 \pm 0,28$ % pro hrubé bílkoviny ($v_x = 7,5$ %) a $4,53 \pm 0,19$ % pro laktózu ($v_x = 4,2$ %);

- opakovatelnost duplicitních měření vzorků činila $\pm 0,0039$ % pro tuk absolutně a $\pm 0,09$ % relativně (ve vztahu ke střední hodnotě sady vzorků), $\pm 0,0032$ % pro hrubé bílkoviny absolutně a $\pm 0,08$ % relativně a $\pm 0,0027$ % pro laktózu absolutně a $\pm 0,06$ % relativně. Směrodatná odchylka opakovatelnosti nepřímého měření základních složek mléka (pro infračervenou analýzu) byla dříve standardně limitována jako maximálně $\pm 0,02$ % absolutně (ČSN 57 0536) a nyní jako maximálně $\pm 0,014$ % (ČSN ISO 8196-1, ČSN ISO 8196-2 a ČSN ISO 8196-3). Je proto zřejmé, že tento parametr byl u všech sledovaných složek splněn se značnou rezervou;

- výsledky poukazují na dobrou kvalitu a vhodnost sady vzorků mléčných standardů pro daný účel přípravy kontroly analytické způsobilosti nepřímých instrumentálních měření v mlékařství a tím i na vhodnost použitého postupu přípravy;

Tab. 6 Výsledky sady mléčných standardů pro původní (nativní) a modifikované, ale nemražené vzorky syrového mléka, před zamražením.

Ukazatel	Tuk	Hrubé bílkoviny	Monohydrát laktózy	Sušina celková	Močovina
jednotka	%	%	%	%	mg/100ml
a	2	2	2	2	2
b	2	2	2	2	2
n	10	10	10	10	10
x	4,145	3,746	4,525	13,325	26,633
sx	0,754	0,28	0,192	1,152	3,313
vx (%)	18,2	7,5	4,2	8,6	12,4
min	3,06	3,27	4,17	11,58	21,05
max	5,65	4,28	4,71	15,49	32,15
m	4,0	3,7	4,61	13,208	26,8
rea	0,003873	0,003162	0,002739	0,00922	0,443565
rer (%)	0,0934	0,0844	0,0605	0,0692	1,6655

3. měření sady vzorků po rozmražení po 31 dnech úchovy (Tab. 7):

- variační rozpětí činilo od 3,065 do 5,675 % pro tuk (2,61 % absolutně a 62,8 % relativně (ve vztahu ke střední hodnotě sady vzorků)), od 3,27 do 4,28 % pro hrubé bílkoviny (1,01 % absolutně a 26,9 % relativně) a od 4,18 do 4,72 % pro monohydrát laktózy (0,54 % absolutně a 11,9 % relativně);

- průměry a směrodatné odchylky sady vzorků byly $4,16 \pm 0,76$ % pro tuk (variační koeficient 18,2 %), $3,76 \pm 0,28$ % pro hrubé bílkoviny ($v_x = 7,4$ %) a $4,54 \pm 0,19$ % pro laktózu ($v_x = 4,3$ %);

- opakovatelnost duplicitních měření vzorků činila $\pm 0,0061$ % pro tuk absolutně a $\pm 0,15$ % relativně (ve vztahu ke střední hodnotě sady vzorků), $\pm 0,0022$ % pro hrubé bílkoviny absolutně a $\pm 0,06$ % relativně a ± 0 % pro laktózu absolutně a ± 0 % relativně. Směrodatná odchylka opakovatelnosti nepřímého měření základních složek mléka (pro infračervenou analýzu) byla dříve standardně limitována jako maximálně $\pm 0,02$ % absolutně (ČSN 57 0536) a nyní jako maximálně $\pm 0,014$ % (ČSN ISO 8196-1, ČSN ISO 8196-2 a ČSN ISO 8196-3). Je proto zřejmé, že tento parametr byl u všech sledovaných složek splněn se značnou rezervou;

- výsledky poukazují na dobrou kvalitu a vhodnost sady vzorků mléčných standardů pro daný účel přípravy kontroly analytické způsobilosti nepřímých instrumentálních měření v mlékařství a tím i na vhodnost použitého postupu přípravy.

Tab. 7 Výsledky sady mléčných standardů pro původní (nativní) a modifikované, ale nemražené vzorky syrového mléka, před zamražením.

Ukazatel	Tuk	Hrubé bílkoviny	Monohydrát laktózy	Sušina celková	Močovina
jednotka	%	%	%	%	mg/100ml
a	2	2	2	2	2
b	2	2	2	2	2
n	10	10	10	10	10
x	4,155	3,755	4,537	13,356	25,975
sx	0,758	0,276	0,193	1,15	3,337
vx (%)	18,2	7,4	4,3	8,6	12,8
min	3,065	3,27	4,18	11,6	20,1
max	5,675	4,28	4,72	15,515	32,4
m	4,008	3,71	4,625	13,235	26,075
rea	0,006124	0,002236	0	0,005244	0,351426
rer (%)	0,1474	0,0596	0	0,0393	1,3529

Celkové hodnocení výsledků modelového testu ukazuje na dobrou stabilitu středních hodnot i variability hlavních složek mléka v sadě mléčných standardů mezi termíny měření (1. měření pro původní vzorky, 2. až 3. pro rozmražené vzorky) po dobu jednoho měsíce (Tab. 4 až 7), a stejně tak na dobrou stabilitu a zároveň i výbornou hodnotu opakovatelnosti měření hodnot hlavních složek mléka ve vzorkové sadě (Tab. 8). Stabilita všech sledovaných statistických parametrů sady pilotních vzorků v testovací periodě potvrdila, že použitý způsob tvorby a ošetření sady byl spávný a použitelný pro zamýšlený účel.

Tab. 8 Přehled dynamiky významných charakteristik (parametrů stability) sady pilotních vzorků mléka před a během zamražení.

Ukazatel	Tuk	Hrubé bílkoviny	Monohydrát laktózy	Sušina celková	Močovina
jednotka	%	%	%	%	mg/100ml
Před Z, x	4,144	3,716	4,525	13,286	25,07
Po Z 10, x	4,13	3,729	4,525	13,291	24,355
Po Z 21, x	4,145	3,746	4,525	13,325	26,633
Po Z 31, x	4,155	3,755	4,537	13,356	25,975
Před Z, sx	0,78	0,28	0,195	1,176	3,542
Po Z 10, sx	0,757	0,276	0,191	1,151	3,393
Po Z 21, sx	0,754	0,28	0,192	1,152	3,313
Po Z 31, sx	0,758	0,276	0,193	1,15	3,337
Před Z, rer %	0,1207	0,0851	0,0699	0,0694	0,7647
Po Z 10, rer %	0,1083	0,0948	0,0699	0,0733	1,4194
Po Z 21, rer %	0,0934	0,0844	0,0605	0,0692	1,6655
Po Z 31, rer %	0,1474	0,0596	0	0,0393	1,3529

Z = zamražení vzorků; 10, 21 a 31 = dny po zamražení do rozpuštění a homogenizace k analýze.

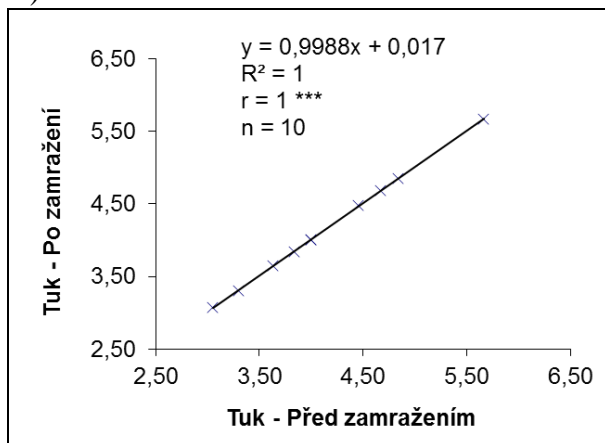
Prokázaná výborná stabilita hodnot opakovatelnosti měření hlavních složek mléka během testu svědčí o:

- 1) - výborné konstrukci průtočných systémů a výborných vlastnostech měřicích systémů použité instrumentace Bentley DairySpec;
- 2) - výborných měřicích schopnostech konkrétního použitého přístroje uvedeného typu;
- 3) - dobrém postupu tvorby a dobrých složkových vlastnostech vytvořené sady kontrolních vzorků mléka.

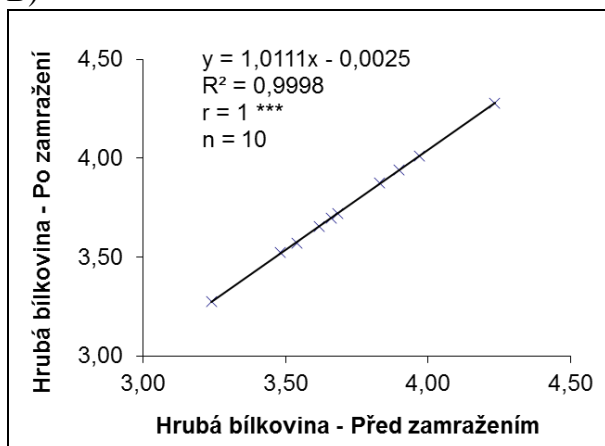
Směrnice lineárních regresí (Obr. 1, A, B, C) byly blízké hodnotě 1,0 a existovala minimální posunutí relevantních přímk, kde korelační koeficienty v hodnotě 1 byly statisticky vysoce významné ($P < 0,001 = ***$). To znamená, že 100 % variability hodnot pro T, 99,98 % pro HB a 99,93 % pro L ve vzorcích po zamražení bylo určeno variabilitou výsledků v původních vzorcích mléka před jejich zamražením, což je zásadí sdělení a interpretace.

Obr. 1 Lineární regrese mezi výsledky základního složení kravského mléka referenční sady vzorků před zamražením (osa x) a po (31 dnů) zamražení, rozpuštění a rehomogenizaci (osa y) pro obsah tuku (A), hrubých bílkovin (B) a monohydrátu laktózy (C).

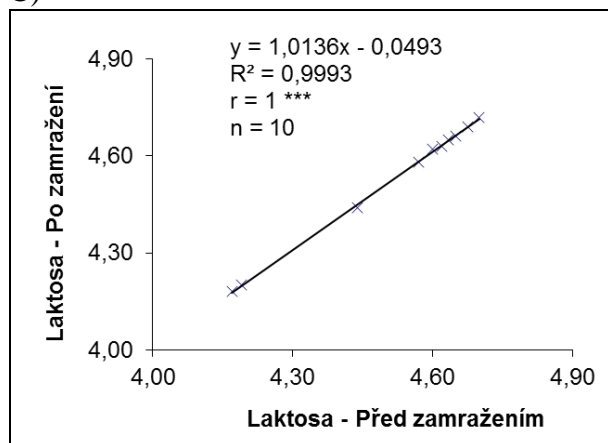
A)



B)



C)



Dále byla zaznamenána v diferenci statistice významnost průměrných rozdílů výsledků složek mléka ($P < 0,001$; Tab. 9) před zamražením a po zamražení, během 31 dnů uložení sady pilotních (referenčních, kontrolních) vzorků mléka. Nicméně, významnost těchto průměrných rozdílových hodnot je dána zejména jejich velmi nízkou variabilitou (0,0048 % T; 0,0054 % HB; 0,0059 % L) při jinak velmi nízkých hodnotách zmíněných odchylek (0,012 % T; 0,039 % HB; 0,012 % L), což činí nízké relativní procento ve stabilitě sledovaných hodnot (jenom 0,29 % T; 1,05 % HB; 0,27 % L), což je významné pro daný účel, který je tímto, kvalifikovaným odhadem, opravňován. V obecných materiálech a historicky je analytická odchylka nezřídka připouštěna až v relativní hodnotě 5 %.

Tab. 9 Diferenční statistika mezi výsledky základního složení kravského mléka referenční sady vzorků před zamražením a po (31 dnů) zamražení, rozpuštění a rehomogenizaci (výsledek po zamražení mínus před zamražením) pro obsah tuku (A), hrubých bílkovin (B) a monohydrátu laktózy (C).

Parametr	A (%)	B (%)	C (%)
Diference	po - před	po - před	po - před
n	10	10	10
d	0,012	0,039	0,012
sd	0,0048	0,0054	0,0059
t	7,5	21,67	6,1
sig	***	***	***

n = počet případů; d = průměrný rozdíl; sd = směrodatná odchylka průměrné difference; t = hodnota (kritérium) párového t-testu; sig = významnost rozdílu ($P < 0,001 = ***$);

Uvedené skutečnosti potvrzují validaci postupu přípravy sady mléčných standardů, který je uveden následovně (III) pro uvedené účely. Odvozeno kvalifikovaným odhadem z četných vlastních výsledků a zkušeností, vhodné variační rozpětí hodnot pilotní sady mléčných vzorků by mohlo být cca: od 2,9 do 5,0 % pro tuk (T); od 3,0 do 3,7 % pro hrubé bílkoviny (HB); od 4,6 do 5,0 % pro monohydrát laktózy (L). Logicky, náhodně vyšší variační rozpětí složení sady vzorků mléka bude principiálně zvyšovat korelační koeficienty shody výsledků různých měření stejné vzorkové sady a do určité míry tak není na závadu.

III) Doporučené podmínky a postupy přípravy sady vzorků (mléčných standardů) pro výkonnostní testy analytické způsobilosti měření základního složení mléka pro nepřímé metody po hlubokém zmražení a dlouhodobém uložení

Jako závěr vývoje metodického postupu lze z výsledků testů doporučit následující dílčí postupy (jádro certifikované metodiky):

- sada 10 mléčných standardů pro aplikaci ve výkonnostním testování analytické způsobilosti je tvořena bazénovými vzorky mléka z podmínek rychlého zchlazení v tanku po nadojení od stád s počtem somatických buněk cca do 250 tis./ml původního mléka;

- pro získání potřebných variačních oborů, reprezentativních středních hodnot a variability hlavních složek vhodných pro proficiency testing čtyři až šest vzorků tvoří původní bazénové, důkladně, ale šetrně, promíchané mléko od různých plemen dojnic (Holštýn; Czech Fleckvieh, Jersey);

- tuková složka mléka ve zbývajících vzorcích ($n = 3$) se upraví (HANUŠ et al., 2003, 2006 a, b, 2011) směrem nahoru i dolů po gravitační frakcionaci mléka ve vyšší válcové nádobě (10 litrů směsného mléka všech vzorkovaných plemen) se spodním vypustným kohoutem (přikrytá hladina mléka během chlazení 8 hodin při ≤ 5 °C), který spodním vypouštěním umožní získání nízkotučné (spodní díl), střednětučné (střední díl) a po zamíchání tučné frakce mléka (horní díl). Nízkotučná frakce je použita jako jeden samostatný vzorek s tvorbou spodní hodnoty tukové škály. Vysocetučná frakce bude šetrně, ale důkladně, vmíchána do dvou vzorků s jejím 25 až maximálně 40ti procentním podílem do základu (mléko vybraného plemene);

- tuková manipulace, vlivem rozdílů specifických hmotností jednotlivých složek mléka, přispěje i k mírnému posunu hodnot bílkovin a laktózy u relevantních vzorků mléka (podle výsledků HANUŠ et al., 2003, 2011);

- do jednoho, původem bazénového vzorku mléka, pro redukci zejména laktózy (spodní hodnota), je možné přidat maximálně 10 % podíl pitné vody. Při vyšším přídávku by bylo třeba dotovat i minerální složky (podle HANUŠ et al., 2010), což pro tento účel není považováno za vhodné;

- příznivé variační obory, související reprezentativní střední hodnoty a variabilita hlavních složek pro proficiency testing mohou činit kvalifikovaným odhadem pro tuk 2,90 (minimum) až 5,00 % (maximum), pro hrubé bílkoviny 3,00 až 3,70 % a pro monohydrát laktózy 4,60 až 5,00 % a variační koeficienty minimálně ± 20 , ± 10 a ± 5 %, přičemž uvedené hodnoty jsou přibližné, neboť mléko, jako živý materiál z živého zdroje, je pro odběr se striktně předepsanými parametry složení obtížně odhadnutelné;

- vzorky jsou hluboce zmrazeny v tekutém dusíku (-196 °C) a uloženy v mrazničce (-30 °C) do analýzy podle předchozích popsaných postupů (HANUŠ et al., 2008 b, c);

- statistické zpracování výsledků výkonnostního testu proběhne na bázi derivace referenčních hodnot jako očištěných středních hodnot z výsledků testu (podle nepřímých metod analýz) pro vyjádření věrohodnosti (pomocí ukazatele Euklidické distance nebo Z-score (HANUŠ et al., 2007 b, 2008 a)) výsledků měření podle průměrných odchylek a variability odchylek hodnot měření od této reference.

4) Závěr certifikované metodiky

Prezentovaný metodický postup přípravy standardních mléčných vzorků k hlubokému zmražení a aplikaci ve výkonnostním testování analytické způsobilosti při určení základního složení mléka nepřímými metodami objektivně není technicky příliš náročný, nicméně, je jednoznačně technologicky specifický a proto bylo třeba ho vyvinout a zpracovat v písemné formě jako jasný návod pro postup relevantních analytických pracovišť.

Hluboké zmražení mléka pro účely referenčních, standardních a pilotních vzorků je technologicky náročnější, než prostá chemická konzervace, a zejména je náročné na kvalitu mléka, má-li proběhnout bezproblémově s udržením stability pilotů. Proto byly popsány podmínky postupu tvorby sady referenčních vzorků k vytvoření vhodných předpokladů pro stabilitu konzistence a složení.

Příprava sady mléčných vzorků pro výkonnostní testy výsledků nepřímých mlékařských analytických metod je popsána s cílem dosáhnout reprezentativních (charakteristických pro relevantní materiál a obor měření) středních hodnot, potřebného variačního rozpětí a variability hodnot základních složek mléka a také zajištění předpokladů jejich fyzické stability pro ošetření hlubokým zmražením a jejich úspěšné rehomogenizace a stability výsledků měření po revitalizaci vzorků.

III) Srovnání „novosti postupů“ a předání certifikované metodiky: Postup přípravy standardních vzorků pro hluboké zmražení a aplikaci ve výkonnostním testování analytické způsobilosti při určení složení mléka nepřímými metodami

- vyvinutá certifikovaná metodika byla předána do užívání systému kontroly laboratorní práce Bentley Czech s.r.o. v elektronické i písemné formě 5. 11. 2019;
- jedná se o inovovaný postup přípravy mléčných standardů pro hluboké zamražení k provádění výkonnostních testů analytické způsobilosti laboratoří (rutinních metod analýz) s potřebným oborem variability základních složek mléka pro zajištění věrohodnosti dat složení mléka k účelům šlechtitelské práce nebo kontroly kvality mléka pro proplácení. Výsledky jsou uvedením známých poznatků v nových souvislostech. Předpokládá se využití postupu ve střední a východní Evropě (vedle ČR i Slovensko, Ruská federace, Ukrajina, Bělorusko, Polsko, Litva, Lotyšsko, Estonsko, Maďarsko, Bulharsko, Rumunsko, Srbsko, Černá Hora, Bosna a Hercegovina, Severní Makedonie, Chorvatsko, Slovinsko a Turecko);
- vývoj postupu a metody přípravy mléčných standardů je zajištěn vlastními konkrétními výsledky. Vyhodnocením těchto výsledků vznikl postup, který je metodickým podkladem pro firmy kontroly kvality analýz mléka, ale také pro zajištění auditu relevantních akreditačních orgánů v oblasti analýz mléka;
- uvedené postupy ověření a podpory spolehlivosti dat analýz mléka jsou používány v souvislosti s vývojem situace kolem kontroly složení a kvality mléka a až doposud byly v podstatě dílčím způsobem řešeny, ale jiným postupem, nikoliv uvedeným způsobem.

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

- kontrola existence certifikované metodiky jako pracovního postupu pro podporu spolehlivosti a věrohodnosti dat analýz základního složení mléka pro zajištění efektivity plemenářské práce a objektivní kontroly kvality syrového mléka;
- kontrola aplikace certifikované metodiky je proveditelná prostřednictvím revize dokladů o provádění kontroly způsobilosti analytické práce (proficiency testing) v mléčných laboratořích s nepřímými rutinními metodami sériových analýz prostřednictvím organizace Bentley Czech s.r.o.;
- certifikovaná metodika postupu tvorby mléčných standardů byla zpracována v šesti exemplářích a předána v kroužkové vazbě na příslušná pracoviště Bentley Czech s.r.o. a do knihovny a na pracoviště Výzkumný ústav mlékárenský Praha a Mendelova univerzita v Brně Agronomická fakulta a informace o ní na MZe a do RIV.

V) Ekonomické aspekty

Ekonomický dopad je součástí kontroly mléčné užitkovosti pro využití ve šlechtitelské práci a monitoringu zdravotního stavu krav a kontroly kvality syrového mléka pro účely proplácení. Plemenářskou práci u dojeného skotu i kontrolu a proplácení kvality mléka lze efektivně realizovat pouze na základě spolehlivých výsledků analýz. Vyvinutý a testovaný postup podporuje tuto spolehlivost analytických výsledků kontroly užitkovosti pro potřeby kontroly dědičnosti a spolehlivost výsledků kvality syrového mléka. Na bázi plemenářské práce v chovu dojnic a poradenství ke zdravotnímu stavu dojnic a kontroly kvality může tvořit podíl do 1,1 % (s ohledem na celou KU a celý systém kontroly kvality) z efektu ve smyslu genetického zisku další generace dojnic a z efektu podpory kvality mléka. Uvedené je dáno redukcí běžných nedostatků způsobených případnou chybnou informací v KU nebo v systému kontroly platby podle kvality. Objem případných ztrát z chyb v KU nebo v systému kontroly kvality syrového mléka je ovšem obtížné vyčíslit konkrétněji. Na úrovni státu, při daném rozsahu a vlivu KU a systému kontroly kvality, 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 Bentley Czech s.r.o. činit podle kvalifikovaného odhadu v KU celkem 35 tis. Kč (náklady na úpravu metody odběru a míchání vzorků, tedy metodických postupů pro pracovníky kontrolní laboratoře). Přínos pro uživatele (Bentley Czech) je v podpoře spolehlivosti postupu přípravy kontrolních mléčných standardů s relevantní variabilitou složek pro výkonnostní testování analytické způsobilosti a věrohodnosti výsledků. Tento lze na nepřímých efektech kvalifikovaně odhadnout na 110 tis. Kč ročně podle frekvence přípravy a frekvence výkonnostních testů, stejně jako počtu zahrnutých laboratoří. Efekt je opakovatelný po rocích.

VI) Seznam použité související literatury

5) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky

- APLAC: T032 Dairy proficiency testing program. October 2002, APLAC 2002, 40.
- ARDÖ, Y.: Bronopol as a preservative in milk samples. *Milchwissenschaft*, 34, 1979, 1, 14-16.
- 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.
- BARBANO, D. M.- LYNCH, J. M.- FLEMING, J. R.: Direct and indirect determination of true protein content of milk by Kjeldahl analysis: collaborative study. *Journal of the AOAC*, 1991, 281-288.
- 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.: Precision and accuracy of infrared milk analysis. *Journal of the AOAC*, 55, 1972, 3, 488-497.
- BIGGS, D. A.: Instrumental infrared estimation of fat, protein, and lactose in milk: collaborative study. *Journal of the AOAC*, 61, 1978, 5, 1015-1034.
- BIGGS, D. A.- JOHANSSON, G.- SJAUNJA, L. O.: Analysis of fat, protein, lactose, total solids by infra-red absorption. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Doc. 208, 1987, 21-29.
- 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.
- BUCHBERGER, J.- KIERMEIER, F.: Über die Eignung von Natriumazid zur Konservierung von Milchproben. *Deutsche Molkerei-Zeitung* (Kempten Allgäu), F 8, 1975, 192-194.
- BUCHBERGER, J.- WEISS, G.- KIERMEIER, F.- PROBST, A.: Reproduzierbarkeit und Genauigkeit bei Fett-, Eiweiss- und Lactosebestimmung mit Hilfe der Infrarot-Spektrophotometrie (IRMA II-Gerät). *Milchwissenschaft*, 26, 1971, 11, 687-693.
- CASTANEDA, R.: Reference system and centralized calibration for milk recording testing in Argentina. In: *Proc. of 36th ICAR biennial session*, Niagara Falls, USA, 2009, 309-313.
- 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.
- 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 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.
- FUCHS, M.: Der AFEMA-Sterntest: 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 mlekerskih 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.
- 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.
- GRAPPIN, R.- PACKARD, V. S.- GINN, R. E.: Repeatability and accuracy of Dye-binding and Infra-red methods for analyzing protein and other milk components. *Journal of Food Protection*, 43, 1980, 5, 374-375.
- KROGER, M.: Milk sample preservation. *J. Dairy Sci.*, 68, 1985, 783-787.
- KUPKA, K.: Statistické řízení jakosti. TriloByte. ISBN 80-238-1818-X, 1997, 119.
- KVAPILÍK, J.- SUCHÁNEK, B.: Vliv konzervace vzorků mléka na výsledky rozborů. *Živočišná Výroba*, 19, 1974, 1, 31-38.
- LERAY, O.: CECALAIT: an organization to support analytical quality assurance in 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, 349-360.
- LERAY, O.: Reference and calibration system for routine milk testing – advantages / disadvantages, choice criteria. In: 3rd ICAR reference laboratory network meeting – Kuopio, Finland. Breeding, production recording, health and the evaluation of farm animals. EAAP publication, 2007, 311-317.
- LERAY, O.: Update on ICAR reference laboratory network. Identification, breeding, production, health and recording of farm animals. In: Proc. of 36th ICAR biennial session, Niagara Falls, USA, 2009, 291-294.
- MARTÍNEZ DE LA VARA, J. A.- HIGUERA, A. G.- ESTEBAN, M. R.- ASENSIO, J. R.- DELGADO, M. C.- BERRUGA, I.- MOLINA, A.: Monitoring bulk milk quality by an integral traceability system of milk. *Journal of Applied Animal Research*, 2018, 46, 1, 784-790. <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1403327>
- 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.
- MILLÁN-VERDÚ, C.- GARRIGÓS-OLTRA, L.- BLANES-NADAL, G.- DOMINGO-BELTRÁN, M.: The History of Optical Analysis of Milk: The Development and Use of Lactoscopes. *Journal of Chemical Education*, 80, 7, 2003, 762-767.

- 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.
- PITKÄLÄ, A.- GINDONIS, V.- WALLIN, H.- HONKANEN-BUZALSKI, T.: Interlaboratory proficiency testing as a tool for improving performance in laboratories diagnosing bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*, 88, 2005, 2, 553-559.
- 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. I. Infrared spectrophotometry for analysis of fat, protein and lactose in milk. *Acta Agric. Scand.*, 34, 1984 a: 249-259.
- 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 b: 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 c: 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.
- SJAUNJA, L. O.- ANDERSSON, I.: Laboratory experiments with a new infrared (IR) milk analyzer, the Milko-Scan 605. *Acta Agric. Scand.*, 35, 1985: 345-352.
- SHERBON, J. W.: Collaborative study of the Pro-Milk method for the determination of protein in milk. *Journal of the AOAC*, 58, 1975, 4, 770-772.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.: 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. *Vet. Med. Praha*, 37, 1, 1992 a: 21-31.
- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- JANŮ, L.- MACEK, A.- ZAJÍČKOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.: Impact of different milk yields of cows on milk quality in Bohemian spotted cattle. *Acta Vet. Brno*, 76, 4, 2007 a, ISSN 1801-7576, 563-571.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- JEDELSKÁ, R.: Diagnostic use of proficiency testing in dairy laboratory. *Acta agriculturae slovenica*, 2004, 84, 1, 37-42.
- 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.- ŽVÁČKOVÁ, I.: 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. *Vet. Med. Praha*, 37, 1, 1992 b: 33-43.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- GABRIEL, B.: The effect of sample aging on the accuracy of an infrared analysis of basic milk composition. *Vet. Med.-Czech*, 37, 3, 1992 c: 149-160.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- KOPEC, T.- YONG, T.- JANŮ, L.: Validation of modified milk reference sample in terms of its suitability for infra-red analysis calibration via evaluation of physical properties. Ověření modifikovaného referenčního vzorku mléka ve smyslu jeho vhodnosti pro kalibraci infračervené analýzy pomocí hodnocení fyzikálních vlastností. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, ISSN 1211-8516, LVIII, 2, 2010, 101-110.
- 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 b, 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 Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, ISSN 1211-8516, LVI, 5, 2008 b, 57-68.
- 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.- LERAY, O.- PYTLOUN, J.- MENEGAIN, E.- TROSSAT, P.- GENČUROVÁ, V.- MATOUŠ, E.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- DOLÍNKOVÁ, A.: Retrospektiva vlivu celosvětové laboratorní integrace na zvyšování věrohodnosti výsledků v oboru mlékařské analytické práce. A retrospective of the international laboratory integration impact on reliability of milk analysis data. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, ISSN 1211-8516, 2000, XLVIII, 4, 121-131.
- 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 Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, ISSN 1211-8516, LIX, 1, 2011, 101-112.
- HANUŠ, O.- ŽVÁČKOVÁ, I.: Přeprava vzorků mléka v kontrole užítkovosti. *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, ISSN 0139-7265, 1989, 1, 19-21.
- 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. (In Czech) *Náš Chov*, ISSN 0027-8068, 10, 2008, 80-82.
- JANŮ, L.- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- MACEK, A.- ZAJÍČKOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.: Influences of different milk yields of Holstein cows on milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Vet. Brno*, 76, 4, 2007, ISSN 1801-7576, 553-561.
- KALA, R.- SAMKOVÁ, E.- PECOVÁ, L.- HANUŠ, O.- SEKMOKAS, K.- RIAUKIENÉ, D.: An overview of determination of milk fat: development, quality control measures, and application. Přehled určení mléčného tuku: vývoj, opatření kontroly kvality a použití. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 66, 4, ISSN 1211-8516, 2018, 1055-1064.
- KALA, R.- SAMKOVÁ, E.- HANUŠ, O.- PECOVÁ, L.- SEKMOKAS, K.- RIAUKIENÉ, D.: Milk protein analysis: An overview of the methods – development and application. Analýza mléčných bílkovin: přehled metod – vývoj a použití. *Acta Universitatis Agriculturae et*

Silviculturae Mendelianae Brunensis, 67, 1, ISSN 1211-8516, 2019, 345-359.

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.

SOJKOVÁ, K.- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- GENČUROVÁ, V.- HULOVÁ, I.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Impacts of lactation physiology at higher and average yield on composition, properties and health indicators of milk in Holstein breed. Vlivy fyziologie laktace při vyšší a průměrné užitkovosti na složení, vlastnosti a zdravotní ukazatele mléka dojníc holštýnského plemene skotu. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 41, 1, ISSN 1211-3174, 2010 a, 21-28.

SOJKOVÁ, K.- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- YONG, T.- HULOVÁ, I.- VYLETĚLOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: A comparison of lactation physiology effects at high and lower yield on components, properties and health state indicators of milk in Czech Fleckvieh. Srovnání vlivů fyziologie laktace při vysoké a nižší užitkovosti na složky, vlastnosti a zdravotní ukazatele mléka u Českého strakatého plemene. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 41, 2, ISSN 1211-3174, 2010 b, 84-91.

Předchozí tématicky relevantní certifikované metodiky k problematice provedení a kontrole analýz mléka v kontrole mléčné užitkovosti a kontrole jakosti syrového mléka:

- 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..

- UPLATNĚNÁ METODIKA QF 3019 UM 5 - Příprava referenčního standardu pro kalibraci infraanalýzy mléka se sníženým obsahem hlavních komponent mléka jako dolními hodnotami kalibračních přímk a s vybalancovanou změnou interferenčního vlivu mléčné matrice. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci uplatněné metodiky mezi Výzkumným ústavem pro chov skotu v Rapotíně a ČMSCH a.s., Praha, z 11. 4. 2008 d. HANUŠ, O.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J..

- CERTIFIKOVANÁ METODIKA QJ1510339 RO1418 CM 37 – Validace údaje hodnoty dojivosti v kontrolní den kontroly mléčné užitkovosti podle bezprostředně předchozí historie záznamů. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha a Impuls chovatelské družstvo, družstvo, Bohdalec, z 8. 11. 2018. Datum certifikace 13. 11. 2018 (č. 10898 – 2018/ČPI). HANUŠ, O.- CHLÁDEK, G.- JEDELSKÁ, R.- FALTA, D.- ROUBAL, P.- KLIMEŠOVÁ, M.- KOPECKÝ, J..

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.

Afilace CM RO1419 CM 38

Projekty a podpory rozvoje instituce (podíly): MZe RO1419 (70 %) a NAZV KUS QJ1230044 (20 %) a MU v Brně jako mimoprojektový výzkum (10 %).

Oponenti CM: Ing. Libor Janů, Ph.D., Everstar s.r.o., Šumperk – chemik a laktolog; Ing. Zdenka Majzlíková, Česká plemenářská inspekce – odborník v kontrole užitkovosti a mlékařství.

Autorský kolektiv (podíly): Oto Hanuš (50 %), Marcela Klimešová (15 %), Gustav Chládek (10 %), Petr Roubal (10 %), Radoslava Jedelská (10 %), Jaroslav Kopecký (5 %).

Autoři děkují panu Ing. Pavlu Heringovi a paní Mgr. Haně Nejeschlebové z Bentley Czech s.r.o. za jejich výbornou technickou spolupráci pro účely této metodiky.

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: 4. 11. 2019

Za zhotovitele:

prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D.



.....

Certifikovaná metodika pro praxi byla podporována řešením projektů MZe NAZV KUS QJ1230044 a MZe RO1419.

7) Přílohové materiály s podklady pro vývojovou práci v rámci certifikované metodiky

Přílohy této certifikované uplatněné metodiky (Postup přípravy standardních vzorků pro hluboké zmražení a aplikaci ve výkonnostním testování analytické způsobilosti při určení složení mléka nepřímými metodami) tvoří vlastní výsledky vývoje a metodického testování, tzn. tabulkové zpracování statistických dat.

Přílohy

Příloha č. 1 až 5

zamrazene_mleko První test Příloha 1

vzorky-pred-zamrazenim_2019-0924 Příloha 2

vzorky-po-zamrazení_2019-1004 Příloha 3

vzorky-po-zamrazení_2019-1015 Příloha 4

vzorky-po-zamrazení_2019-1025 Příloha 5

VIII) Podklady pro registraci do RIV

CERTIFIKOVANÁ METODIKA RO1419 CM 38 – název: Postup přípravy standardních vzorků pro hluboké zmražení 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). HANUŠ, O.¹- KLIMEŠOVÁ, M.¹- CHLÁDEK, G.²- ROUBAL, P.¹- JEDELSKÁ, R.¹- KOPECKÝ, J.¹.

CERTIFIED METHOD RO1419 CM 38 - title: Procedure for the preparation of standard samples for deep-freezing and application in the analytical proficiency testing at milk composition determination by indirect methods. It is confirmed by signed treaty about application of this certified method between Dairy Research Institute Ltd. Prague and Bentley Czech Ltd. from November 5th 2019. Date of certification November 1st 2019 (n. 8499/2019 - ČPI). HANUŠ, O.¹- KLIMEŠOVÁ, M.¹- CHLÁDEK, G.²- ROUBAL, P.¹- JEDELSKÁ, R.¹- KOPECKÝ, J.¹.

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha; ² Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav chovu a šlechtění zvířat

Zařazení: GM, CC

syrové kravské mléko, bazénové mléko, nepřímá přístrojová metoda, infračervená analýza mléka, mléčný standard, výkonnostní testování analytické způsobilosti

raw cow milk, bulk milk, indirect instrumental method, infrared milk analyse, milk standard, analytical proficiency testing

Certifikovaná aplikovaná metodika je zaměřena na postup přípravy sady mléčných standardů s potřebnou variabilitou hodnot základního složení mléka (tuk (T), hrubé bílkoviny (HB), monohydrát laktózy (L)) pro výkonnostní testování výsledků nepřímých mlékařských analytických metod. Vzorky mléka pak mají být hluboce zmrazeny a po revitalizaci a změření výsledky statisticky hodnoceny za odvození referenčních hodnot jako očištěných aritmetických průměrů z výsledků testu. Vývojem byly zamítnuty nebo potvrzeny určité relevantní metodické kroky (fyziologické a technologické aspekty). Vhodné variační rozpětí hodnot (kvalifikovaným odhadem) by mohlo být cca: od 2,9 do 5,0 % pro T; od 3,0 do 3,7 % pro HB; od 4,6 do 5,00 % pro L. Celkové hodnocení výsledků modelového testu ukazuje na dobrou stabilitu středních hodnot, variability i opakovatelnosti měření hlavních složek mléka v sadě mléčných standardů mezi termíny měření (31 dnů). Použitý způsob tvorby a ošetření sady vzorků mléka byl správný a použitelný pro zamýšlený účel. Směrnice lineárních regresí byly blízké hodnotě 1,0. Korelační koeficienty v hodnotě 1 byly statisticky významné ($P < 0,001$). Postup tak podporuje věrohodnost výsledků rutinních analýz mléka pro hospodářské účely: - šlechtění dojnic a kontrolu jejich zdraví; - základ proplácení syrového mléka podle kvality.

The certified applied method is focused on the process of preparation of a set of milk standards with the necessary variability of basic milk composition values (fat (F), crude protein (CP), lactose monohydrate (L)) for proficiency testing of results of indirect dairy analytical methods. Milk samples should then be deep-frozen and, after revitalization and measurement, statistically evaluated to derive reference values as purified arithmetic means

from the test results. Developments have rejected or confirmed certain relevant methodological steps (physiological and technological aspects). A suitable range of variation (qualified estimate) could be about: from 2.9 to 5.0% for F; from 3.0 to 3.7% for CP; from 4.6 to 5.00% for L. The overall evaluation of the model test results shows good stability of mean values, variability and repeatability of measurements of the main milk components in the set of milk standards between the measurement dates (31 days). The method used to form and treat a set of milk samples was correct and applicable for the intended purpose. The linear regression slopes were close to 1.0. Correlation coefficients of value 1 were statistically significant ($P < 0.001$). The procedure thus supports the reliability of the results of routine analyzes of milk for farming and economy purposes: - breeding of dairy cows and their health state control; - the basis for the raw milk quality payment.

Specifické údaje výsledku

Interní kód produktu

Certifikovaná metodika RO1419 CM 38

Lokalizace výsledku

Pracoviště mléčné laboratoře pro organizaci proficiency testing Bentley Czech s.r.o.

Technické parametry výsledku

Systematická podpora věrohodnosti výsledků analýz základního složení mléka (tuk, hrubé bílkoviny, monohydrát laktózy) nepřímými metodami pro účely šlechtění dojnic, kontrolu jejich zdravotního stavu a proplácení kvality mléka. Výsledky dokumentují toto zajištění pro relevantní dozorové orgány.

Ekonomické parametry výsledku

Ekonomický dopad je součástí kontroly mléčné užitkovosti pro využití ve šlechtitelské práci a monitoringu zdravotního stavu krav a kontroly kvality syrového mléka pro účely proplácení. Plemenářskou práci u dojeného skotu i kontrolu a proplácení kvality mléka lze efektivně realizovat pouze na základě spolehlivých výsledků analýz. Vyvinutý a testovaný postup podporuje tuto spolehlivost analytických výsledků kontroly užitkovosti pro potřeby kontroly dědičnosti a spolehlivost výsledků kvality syrového mléka. Na bázi plemenářské práce v chovu dojnic a poradenství ke zdravotnímu stavu dojnic a kontroly kvality může tvořit podíl do 1,1 % (s ohledem na celou KU a celý systém kontroly kvality) z efektu ve smyslu genetického zisku další generace dojnic a z efektu podpory kvality mléka. Uvedené je dáno redukcí běžných nedostatků způsobených případnou chybnou informací v KU nebo v systému kontroly platby podle kvality. Objem případných ztrát z chyb v KU nebo v systému kontroly kvality syrového mléka je ovšem obtížné vyčíslit konkrétněji. Na úrovni státu, při daném rozsahu a vlivu KU a systému kontroly kvality, 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 Bentley Czech s.r.o. činit podle kvalifikovaného odhadu v KU celkem 35 tis. Kč (náklady na úpravu metody odběru a míchání vzorků, tedy metodických postupů pro pracovníky kontrolní laboratoře). Přínos pro uživatele (Bentley Czech) je v podpoře spolehlivosti postupu přípravy kontrolních mléčných standardů s relevantní variabilitou složek pro výkonnostní testování analytické způsobilosti a věrohodnosti výsledků. Tento lze na nepřímých efektech kvalifikovaně odhadnout na 110 tis. Kč ročně podle frekvence přípravy a frekvence výkonnostních testů, stejně jako počtu zahrnutých laboratoří. Efekt je opakovatelný po rocích.

Kategorie výsledku podle nákladů na jeho dosažení
A – náklady \leq 5 mil. Kč (do 5 MKč)

Vlastník výsledku
IČ organizace
26722861 a 62156489

Název organizace
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha; Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta

Stát organizace
CZ

Možnost využívání výsledku
Povinnost získání licence
N – nevyžaduje se (ne)

Povinnost odvést licenční poplatek
N – nevyžaduje se (ne)