



Certifikovaná metodika RO0513 CM 24 - název:

Identifikace subklinické ketózy krav v časně laktaci podle výsledků dojivosti a individuálních vzorků mléka v kontrole užítkovosti a interpretace výsledků

Certifikovaná uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému kontroly mléčné užítkovosti pro identifikaci subklinické ketózy a podporu její prevence, zdraví dojnic a kvality mléka.

I) Cíl certifikované uplatněné metodiky:

Cílem je rozšíření spektra interpretačních a poradenských postupů prováděných pravidelně a systémově podle výsledků analýz individuálních vzorků mléka v kontrole užítkovosti dojnic za účelem prevence jejich produkčních poruch a podpory zdraví zvířat stejně jako kvality potravinové suroviny a provozní jistoty chovatelů.

Náplň certifikované uplatněné metodiky:

Implementace dosažených výsledků, získaných na základě předchozího výzkumu a vývoje v rámci řešení projektů NAZV KUS QJ1210301, RO0513 (z února 2013) a FA MENDELU TP 2/2013 do prostředí rutinní kontroly mléčné užítkovosti provozované Českomoravskou společností chovatelů, a.s. a nadprůměrných chovů dojnic v České republice pro celkové zlepšení bezpečnosti mléčného potravinového řetězce.

Zdroj certifikované uplatněné metodiky:

Projekty NAZV KUS QJ1210301, RO0513 (z února 2013) a FA MENDELU TP 2/2013.

Zpracovali dne: 15. 11. 2013; Oto Hanuš¹, Daniel Falta², Petr Roubal¹, Gustav Chládek², Marcela Vyletěllová - Klimešová¹, Růžena Seydlová¹; 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 15. 12. 2013.

II) Vlastní popis certifikované metodiky

Identifikace subklinické ketózy krav v časně laktaci podle výsledků dojivosti a individuálních vzorků mléka v kontrole užitkovosti a interpretace výsledků

Struktura certifikované metodiky:

- 1) Úvod a současný stav
- 2) Cíl certifikované metodiky
- 3) Vlastní výzkum a vývoj odhadu prahových hodnot subklinické ketózy pro mléčné ukazatele v kontrole mléčné užitkovosti (KU; část A a B) a zajištění rutinních metod pro jejich věrohodné stanovení (část C)
- 4) Interpretace výsledků mléčných ukazatelů v kontrole užitkovosti pro praktické možnosti řízení prevence ketóz, podporu zdraví zvířat a kvality, resp. technologické způsobilosti, syrového mléka – vlastní metodika
- 5) Závěr certifikované metodiky
- 6) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky
- 7) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci certifikované metodiky
- 8) Přílohové materiály s podklady pro vývoj certifikované metodiky

Nejčastěji použité zkratky:

AC = aceton

B = bílkoviny

BHB = beta hydroxybutyrát

CF = České strakaté

ČMSCH = Českomoravská společnost chovatelů

H = Holštýn

KU = kontrola užitkovosti

L = laktóza

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

NEB = negativní energetická bilance

SK = subklinická ketóza

T = tuk

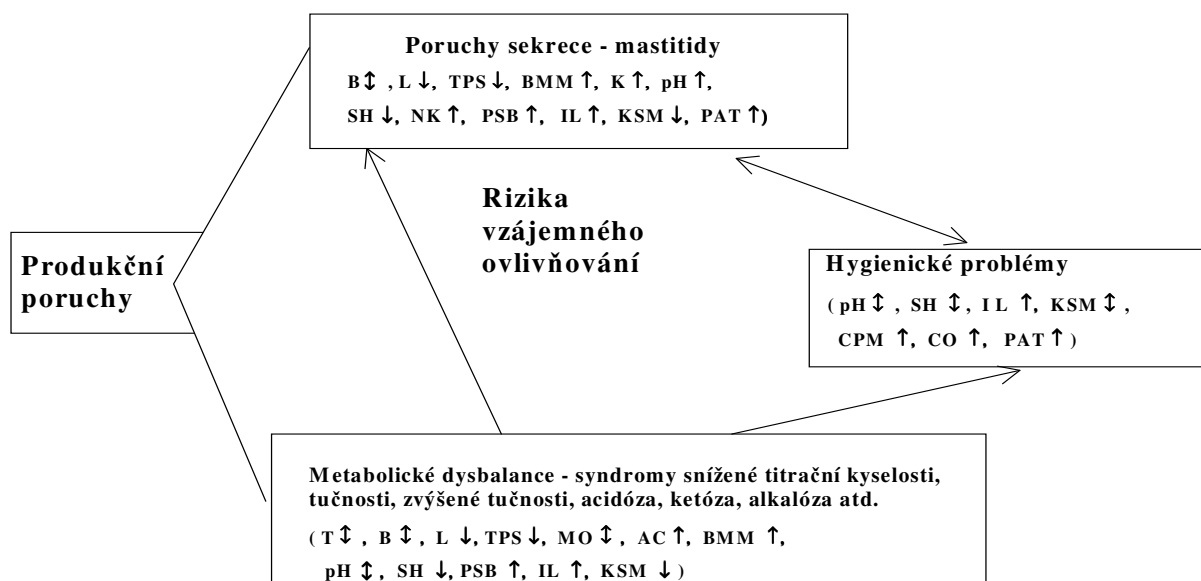
T/B = F/CP = tuk/bílkoviny

T/L = F/L = tuk/laktóza

1) Úvod a současný stav

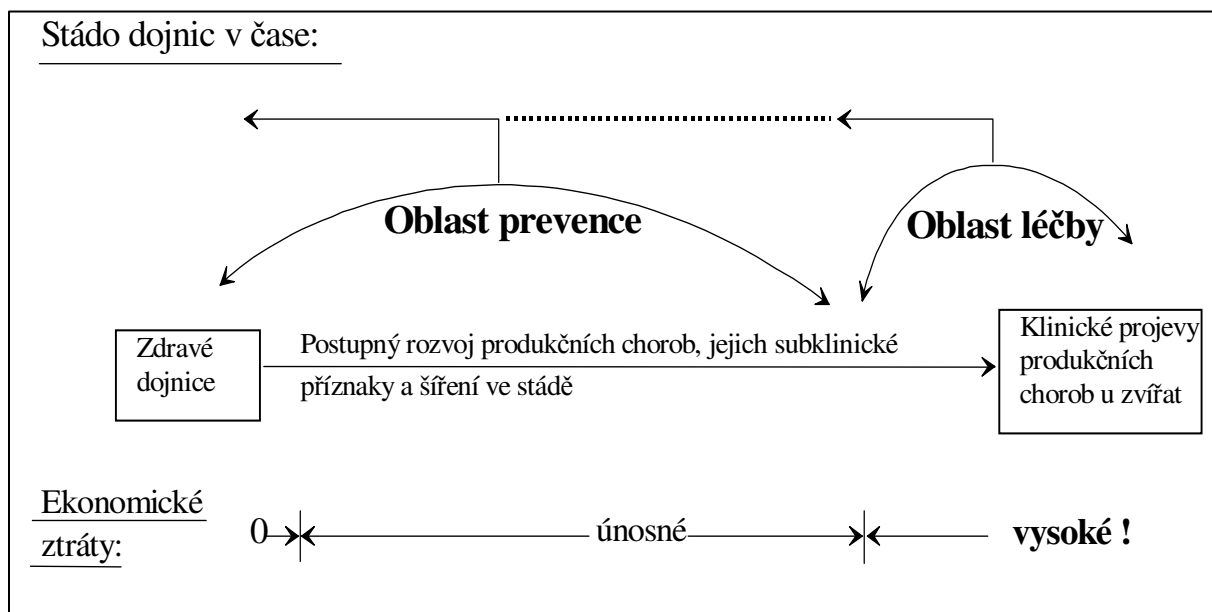
Ketóza jako produkční porucha (Obr. 1), tedy porucha energetického metabolismu, je u vysokoprodukčních dojnic rizikovým faktorem dojivosti, kvality mléka a ohrožením jejich reprodukce i života. Je důležité, avšak ne jednoduché, včas rozlišit její subklinickou formu (Obr. 2). Podle dřívějších výsledků stanovení prahových hodnot ukazatelů ketózy, tedy zejména acetonu a tukových (ketózních) kvocientů syrového kravského mléka, lze, pro průběžnou identifikaci subklinické ketózy v kontrole užitečnosti nebo u real time analytických měřicích systémů v prvovýrobě mléka, zlepšit odhady těchto prahových identifikačních hodnot pro prevenci produkčních poruch dojnic a podporu jejich reprodukce a zdraví.

Obr. 1 Běžný rutinní soubor ukazatelů složení a vlastností mléka a jejich změny ve vztahu k nejčastějším problémům mléčných stád



Seznam zkratk ve schématu: AC aceton; B bílkoviny; BMM bod mrznutí mléka; CO koli bakterie; CPM celkový počet mezofilních mikroorganismů; IL rezidua inhibičních látek; K draslík; KSM kysací schopnost mléka; L laktóza; MO močovina; NK viskozimetrický test; PAT patogenní mikroorganismy; pH nativní kyselost; PSB počet somatických buněk; SH titrační kyselost; T tuk; TPS tukuprostá sušina.

Obr. 2 Schéma uplatnění prevence při snižování ztrát mléčné užitkovosti dojnic v důsledku produkčních chorob - zejména metabolických dysbalancí (často ketózy) a poruch sekrece mléka



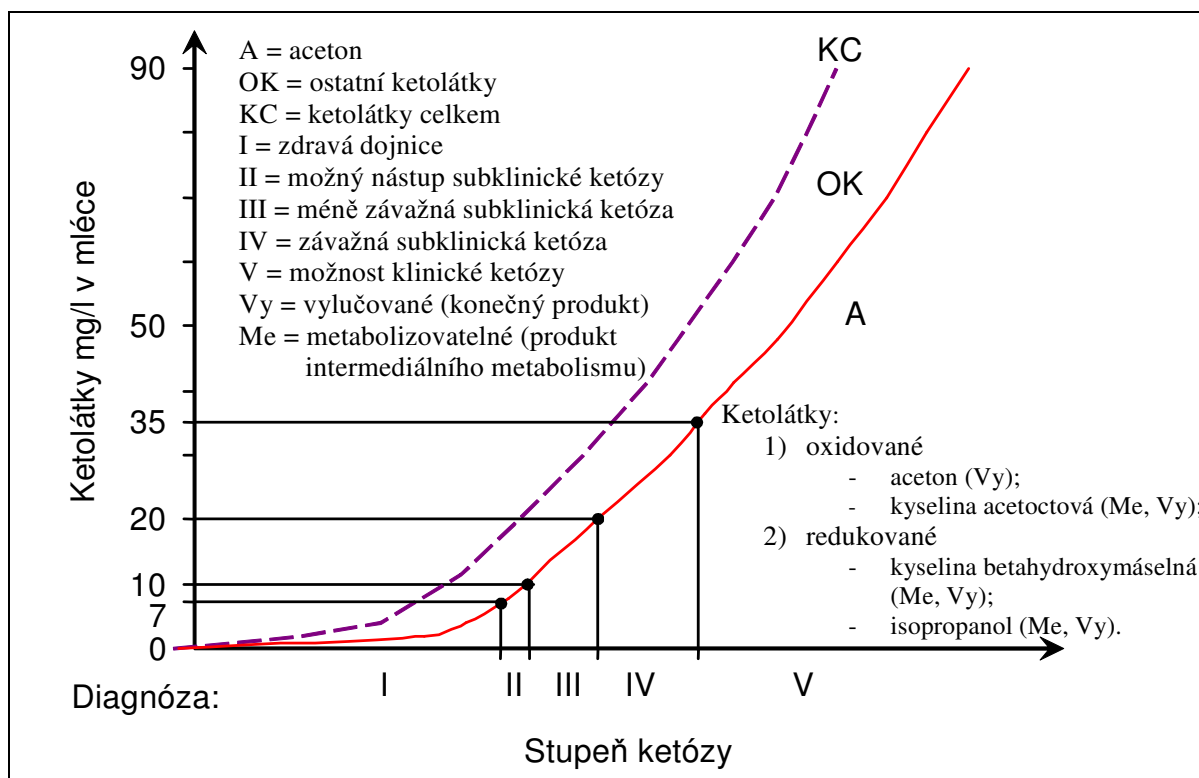
Ketóza jako produkční onemocnění

Ketóza reprezentuje metabolické onemocnění, které se vyskytuje hlavně u vysoce produktivních dojnic. Základní problém ketóz spočívá v deficitu glukosy v krvi a tkáních, který spolu s nedostatkem vhodných uhlovodíků v krmné dávce vede k odbourávání lipidů v játrech. Zvýšený metabolismus jater vede ke zvýšení hladin vedlejších produktů - ketolátů v krevním séru a následně i v mléce dojnice. Ketózy všeobecně jsou v období vzniku tzv. „energetické díry“ resp. negativní energetické bilance po otelení způsobené vyšším výdejem živin laktací z organismu oproti nižšímu přívodu. Jsou charakterizovány odbouráváním tělesných energetických (především tukových) rezerv. Tuk v mléce se tak může nejdříve zvýšit (Tab. 1 a 2) s pokračováním ketózy může pak klesat. Tento jev může vést až k poklesu metabolické funkce jater jejich infiltrací tukem (syndróm lipomobilizace až jaterní steatózy) nebo jaternímu kómatu. Zde je důležitou vlastností regenerační schopnost jater. Průběžně dochází právě ke vzrůstu obsahu ketonových látek v tělních tekutinách (Tab. 1).

Obsah ketolátů (acetonu (AC), acetoacetátu a BHB (betahydroxybutyrátu)) v individuálních vzorcích mléka je tedy indikátorem zdravotního stavu dojnic po porodu a v první třetině laktace ve smyslu výskytu produkčního onemocnění, ketóz. Některé ketony mohou být dále metabolizovány, jiné (např. aceton) odchází z organismu zpravidla močí, dechem, potem a mlékem (Obr. 3). Ketóza vzniká především u dojnic s vysokou dojivostí a vykazuje plíživý charakter nástupu a setrvačnost průběhu. V průběhu ketózy je redukována dojivost i obranyschopnost (riziko zvýšeného výskytu nových mastitidních infekcí) a zhoršena plodnost krav. Mnohé výše zmíněné jevy jsou v omezenějším rozsahu pozorovány i u volně žijících savců. U hospodářských zvířat se zaměřením na vysokou užitkovost se uvedené procesy mohou nicméně vymýkat kontrolním a regulačním mechanismům organismu. Dojde k

onemocnění ketózou zpravidla nejdříve v subklinické a posléze klinické formě (Obr. 2). Kromě dalších příznaků může onemocnění vyústit i v úhyn zvířete. Léčba je nezbytná, avšak s důsledky všech ztrát nákladná.

Obr. 3 Graf dynamiky ketózy u zvířete - schéma nelineárního vzrůstu koncentrace acetonu (ketolátek) v mléce (případně tělních tekutinách) přezvýkavců se stupněm ketózy



Tab. 1 Vliv některých produkčních onemocnění na složení a vlastnosti mléka (podle FAMIGLI BERGAMINI, 1987)

Porucha	Produkce	Tuk	Bílkoviny	Kasein	Laktóza	Ketony - aceton	Močovina	Sušina tukuprostá	Somatické buňky	Titrační kyselost
Acidóza	↑ ↓	↓ ↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↑
Alkalóza	↓	↓	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓	↑	↑ ↑	↓	↑	↓
Ketóza	↓ ↓	↓ ↑	↓	↓	↓ ↓	↑ ↑	↑	↓	↑	↑
Mastitida	↓	↓ ↑	↓ ↑	↓	↓			↓	↑ ↑	↓
Stres		↓	↓							↑

Tab. 2 Praktická interpretace poměru obsah tuku/obsah bílkovin (T/B) v mléce (modifikováno podle: AGABRIEL et al., 1991, 1992; BÍRO et al., 1992; FÜRLI et al., 1992; GEISHAUSER a ZIEBEL, 1995; SCHULZ, 1997; GASTEINER, 2000)

- ve vztahu k fyziologii výživy dojníc (individuální vzorky mléka):			
	nízký T/B	vyhovující T/B	vysoký T/B
- pro holštýnské dojnice	< 1,05	1,05 – 1,18	> 1,18
- kombinovaná a mléčná plemena (Německo)	< 1,1 nedostatek strukturální vlákniny v krmné dávce	1,1 – 1,6	> 1,6 nedostatek energie, riziko ketózy
- ve vztahu k sýrařské technologii (bazénové, resp. cisternové vzorky mléka):			
- ve Francii, mléko obecně	< 1,10	1,10 až 1,20 1,14 až 1,18 nejlepší technologická hodnota	> 1,20

Zvýšený aceton v mléce, jako projev ketózy, snižuje dojivost (o 2 až 9 % při subklinické ketóze a až o 26 % při ketóze klinické; MIETTINEN, 1994) a reprodukci. Prodlužuje servis periodu až o 20 dní (ŘÍHA a HANUŠ, 2000; $P < 0,05$). Také WALDMANN et al. (2003) předpověděli vzrůst pravděpodobnosti opakované inseminace při vzrůstu koncentrace acetonu v mléce při inseminaci a BERAN et al. (2012) našli vztah mezi nejvyššími hodnotami acetonu v mléce a cervikálním hlenem a přežitím spermií během krátkodobého tepelného stresu, které bylo negativně ovlivněno, což činí spermie citlivějšími k vlivům prostředí a může tak snížit jejich oplodňovací efektivitu.

Prevence je významná, protože výskyt ketóz v problémových stádech může být v 1. třetině laktace až 13 %, subklinických pak až 34 %. Frekvence ketóz celkem v běžném stádě činí cca 4 %, v problémovém stádě až 8 % z právě laktujících krav (KAUPPINEN, 1983; UNGLAUB, 1983; ANDERSSON a EMANUELSON, 1985; ŠRÁMEK et al., 1992; HANUŠ et al., 1999; RASMUSSEN et al., 1999). Obecně více autorů (EMERY et al., 1964; VOJTÍŠEK et al., 1991; MIETTINEN, 1995; GREEN et al., 1999; GASTEINER, 2003) se pokusilo pozitivně pozměnit metabolismus časně laktace a korespondující možný nedostatek energie cestou přídatků různých glukoplastických nebo hepatoprotektivních látek (jako propylenglykol, monensin, *Silybum marianum*) do krmných dávek krav.

VOJTÍŠEK et al. (1991) zkrmovali v peripartálním období (2 týdny) kravám ke krmné dávce 0,3 kg šrotu/den Ostropestřce mariánského se známými hepatoprotektivními účinky obsaženého silymarinového komplexu (KOLOUCH et al., 1991). Zaznamenali v tomto experimentu pokles stupně ketonurie krav a pokles acetonu a kyseliny octové v krvi a mléce pokusných krav oproti kontrolním, včetně zvýšení jejich mléčné produkce. Podobně zdokumentovali GREEN et al. (1999) příznivý účinek aplikace kapsulí Monensinu (uvolňujících 335 ± 33 mg/den) v podobě redukce hladiny beta-hydroxybutyrátu v krvi (o 35 %), současného vzrůstu koncentrace glukózy v krvi (o 15 %) a tím omezení uměle indukovaného ketózního stavu dojníc.

Vzhledem k charakteru průběhu ketózního onemocnění dojníc a vzhledem ke skutečnosti, že subklinické formy (bez zjevných příznaků) jsou ekonomicky nebezpečnější (vyšší frekvence výskytu a nepozorovatelnost) než klinické (se zjevnými příznaky u zvířat) je důležitá včasná diagnostika onemocnění. Ketóza a vyšší hladiny ketonů zhoršují reprodukci krav. Indikační schopnosti metod stanovení ketonů lze vhodně využít k monitoringu ketóz ve stádě a k

zavádění protiketózních opatření (EMERY et al., 1964; JAGOŠ et al., 1981; KOLOUCH et al., 1991; VOJTÍŠEK et al., 1991; ILLEK a PECHOVÁ, 1997, 1998) jak preventivních (v případě náznaku subklinických stavů, prostřednictvím operativních změn ve výživě dojnic, aplikace ostropestřece mariánského, propylenglykolu atp.) tak terapeutických (v případě záchytu závažnějších subklinických nebo klinických stavů, kdy jsou již patrné zevní příznaky na zvířeti, aplikace glukózy, inzulinu atp., SAKAI et al., 1993). Je důležité vést o výsledcích monitoringu ketóz a provedených opatření včetně jejich účinnosti pravidelné záznamy.

Význam ketonů (acetonu) v mléce

Koncentrace ketonů, resp. acetonu (AC) v mléce je dobrým indikátorem ketóz (ANDERSSON, 1984, 1988; ANDERSSON a LUNDSTRÖM, 1984 a, b; ANDERSSON a EMANUELSON, 1985; EMANUELSON a ANDERSSON, 1986; GRAVERT et al., 1986; DIEKMANN, 1987; GUSTAFSSON a EMANUELSON, 1993; MOTTRAM, 1996; GEISHAUSER et al., 1997, 1998; HANUŠ et al., 1999, 2001 a; MOTTRAM a MASSON, 2001; MOTTRAM et al., 2002; WOOD et al., 2004). Podle AC lze úspěšně kontrolovat negativní energetickou bilanci (NEB) krav. NEB je rizikové období v počátku laktace, zpravidla s vyšším AC v mléce.

Aceton v krvi a mléce je vysoce korelován ($r = 0,96$; ENJALBERT et al., 2001). U krav s vyšším mléčným AC ve druhém a třetím měsíci laktace ($> 0,25 \text{ mmol.l}^{-1}$) byla zjištěna významná negativní korelace ($r = -0,47$ resp. $-0,42$) k množství energie přijaté krmivem a rovněž k mléčné užitkovosti ($r = -0,30$; GRAVERT et al., 1991). Proto vysoký obsah acetonu v mléce indikuje labilní látkovou výměnu u krav. Významným vlivem na obsah acetonu v mléce je však i kvalita siláží, které jsou významně ketogenním krmivem. Koeficient heritability pro obsah acetonu v mléce činil 0,30 (GRAVERT et al., 1991) pro první tři měsíce laktace a podobal se tak koeficientu mléčné užitkovosti. Bylo tak doporučeno zařazení obsahu AC v mléce jako ukazatele energetické bilance do sledování KU. Genetické (plemenné) faktory subklinické a klinické ketózy a hladiny mléčného AC byly také řešeny (EMANUELSON a ANDERSSON, 1986; MÄNTYSAARI et al., 1991; HANUŠ et al., 2003; WOOD et al., 2004). Použití AC v mléce během laktace jako ukazatele energetického stavu pro genetické zlepšení příjmu krmiva a využití energie dojnicemi bylo tak doporučeno vícekrát (DIEKMANN, 1987; GRAVERT et al., 1986, 1991).

Prevence (Obr. 2) je velmi významná pro snížení ekonomických ztrát, které mohou být ketózou zapříčiněny. Účinná diagnóza a monitoring jsou nezbytné pro dobrou prevenci subklinických stavů ketózy (ANDERSSON, 1988; HANUŠ et al., 1999, 2001). Subklinická ketóza byla často definována jako propad mléčné užitkovosti nebo ztráta tělesné kondice (GUSTAFSSON a EMANUELSON, 1993; HANUŠ et al., 1999; HEUER et al., 1999; GASTEINER, 2003). Diagnostická hladina AC v mléce není v literárních zdrojích stále přijatelně sjednocena. Pohybuje se od 2 do 41 mg.l^{-1} (od 0,03 do 0,7 mmol.l^{-1} ; GUSTAFSSON a EMANUELSON, 1993; GRAVERT et al., 1986; HANUŠ et al., 1999; MIETTINEN, 1995; GASTEINER, 2000). Obě mezní hodnoty se však jeví být přehnané. Horní nad-, resp. dolní podhodnocena. Na základě předchozích praktických zkušeností a vlastních experimentálních výsledků (HANUŠ, 1994; HLÁSNÝ, 1997; HANUŠ et al., 1999) lze považovat za diskriminační hladiny pro odhad subklinické ketózy přibližně následující limity: Ketophan (ketony v moči) $>3+$ ($>7,5 \text{ mmol/l}$); Ketotest (ketony v mléce) $>2+$ ($>15 \text{ mg/l}$); aceton v mléce $>10 \text{ mg/l}$. I když v případě semikvantitativních testů nemohou být používané hranice zcela ostré, v praxi vyhovují zamýšlenému účelu. Určení diskriminačního (diagnostického prahu) limitu AC v mléce pro subklinickou ketózu se tedy nejčastěji pohybovalo kolem 10 mg.l^{-1} . Vyšší hladiny

AC byly také spojeny se zhoršením technologické zpracovatelnosti mléka (HANUŠ et al., 1993).

Metody stanovení acetonu v mléce v praxi

Stanovení mléčného acetonu je prováděno nejčastěji metodami fotometrickými, stájovými semikvantitativními kolorimetrickými testy na nitroprusidové bázi a nepřímou metodou infračervené spektroskopie. Korelace mezi výsledky stájových testů Ketophanu v moči a Ketotestu v mléce činila 0,87 ($P < 0,001$; HANUŠ et al., 2001 c). ENJALBERT et al. (2001) uvedli, že určení beta-hydroxybutyrátu v mléce enzymatickou analýzou nebo proužkovým testem Ketolac poskytuje hodnotné výsledky s prahovou koncentrací 70 až 100 mikromol/l. Kladně hodnotili praktickou jednoduchost Ketolacu. ROOS et al. (2006) hodnotili identifikaci ketózy na základě odečtu acetonu, acetacetátu a beta-hydroxybutyrátu v individuálních vzorcích mléka pomocí kalibrované infračervené metody MSc FT 6000 (MIR-FT) jako uspokojivou, podobně HANSEN (1999).

Pomocí mléčných ketotestů pozorovali GEISHAUSER et al. (1997, 1998) souvislost mezi zvýšeným výskytem ketóz (resp. vyšších hladin ketonů v krvi) a korespondujícím vyšším výskytem levostranné dislokace slezu. HEUER et al. (2001) zjistili treshold (práh) pro subklinickou ketózu v hodnotě od 0,4 do 1,0 mM. Myšlenku monitorovat ketózy systematicky a automaticky ve stádech dojníc v on-line systémech prostřednictvím měření hladin ketonů nebo acetonu (v mléce nebo ve vydechovaném vzduchu) pomocí vestavěných biosensorů prosazovali MOTTRAM (1996), MOTTRAM a MASSON (2001) a MOTTRAM et al. (2002).

Ketóza a ostatní složky mléka a jejich indikační způsobilost

Byl nalezen pozitivní korelační koeficient ($r = 0,30$; $P < 0,001$; HANUŠ et al., 2004 a) mezi log koncentrace AC a koeficientem tuk/bílkoviny v kravském mléce, jako dalším ukazatelem energetického metabolismu krav (Tab. 2). Tento potvrzoval uvedenou vypovídací schopnost obou ukazatelů ve vazbě na trendy naznačené v Obr. 1 a Tab. 1 a 2. Vhodnost dalších mléčných ukazatelů, tuk/bílkoviny (T/B) a tuk/laktóza (T/L), tzv. mléčných ketzních nebo energetických koeficientů, jako ukazatelů subklinické ketózy, byla hodnocena v řadě prací (GEISHAUSER a ZIEBELL, 1995; STEEN et al., 1996; DUFFIELD et al., 1997; GEISHAUSER et al., 1997; REIST et al., 2002; VAN KNEGSEL et al., 2010; SIEBERT a PALLAUF, 2010; HANUŠ et al., 2011 b; MANZENREITER et al., 2013). Převážně bylo poukázáno na praktickou způsobilost zmíněných koeficientů k indikaci subklinické ketózy za předpokladu zohlednění některých vlivných faktorů, jako je např. plemeno dojníc a stadium laktace.

Potřeba pravidelné indikace výskytu ketózy v mléčných stádech

LESLIE (1999) uvedl, že existuje stále více svědectví dokládajících, že většina mléčných stád by profitovala z rutinního monitorovacího programu pro subklinické ketózy, neboť pozitivní test má dobrou předpovědní hodnotu pro blížící se problémy. Použitelnost stádového kontrolního programu je nejvíce ovlivněna citlivostí a pozitivní predikční hodnotou testu stejně jako náklady na test.

HEUER et al. (2000 b) provedli ověření přesnosti predikce vícenásobného regresního modelu pro odhad energetické bilance vysoceužitkového stáda dojníc od 2. do 12. týdne laktace. Do tohoto modelu zahrnuli kontrolu dojivosti a tělesné kondice dojníc (podobně také DUCHÁČEK et al., 2012), test ketonů, obsah tuku, bílkovin a laktózy z kontroly užitkovosti a poměr

tuk/bílkoviny. Závěrem uvedli, že informace z testovacího dne KU bez testu hladiny ketonů a skóre tělesné kondice je dostačující pro odhad průměrné energetické bilance stáda s tím, že velikost stáda limituje správnost předpovědi.

Se sofistikovaným rozvojem rutinních analytických možností mléčných laboratoří KU a výzkumem vzájemných vztahů mléčných ukazatelů a jejich vztahů ke zdraví zvířat lze rozšiřovat i spektrum služeb chovatelům mléčného skotu. Uvedené může mít podobu rozšíření spektra prováděných analýz a vývoje interpretačního software k řízení prevence produkčních poruch krav, snižování ztrát na doživosti, zlepšování jejich zdravotního stavu a kvality produkovaného mléka.

2) Cíle aplikace certifikované metodiky

Obecným cílem certifikované metodiky je zlepšit kontrolu zdraví dojnic, kvalitu syrového mléka, provozní jistotu chovatelů krav a podpořit bezpečnost mléčného potravinového řetězce.

Konkrétním cílem vlastní certifikované metodiky tedy je:

- **validovat možnosti aplikace nepřímé metody MIR-FT pro stanovení ketonů** v individuálních vzorcích mléka v kontrole užítkovosti pro jednu z forem indikace subklinické ketózy;
- ověřit, precizovat a **validovat možnosti indikace subklinické ketózy podle rutinních výsledků analýz individuálních vzorků mléka v KU** jako podklad pro softwarovou konstrukci (v KU - ČMSCH);
- **shrnout praktické aspekty interpretace výsledků acetonu a ketózních složkových koeficientů v mléce s ohledem na monitoring zdravotního stavu dojnic** a možnosti prevence problémových situací ve výživě dojnic a jejich případných produkčních poruch (energetického deficitu (NEB), resp. ketóz).

3) Vlastní výzkum a vývoj odhadu prahových hodnot subklinické ketózy pro mléčné ukazatele v kontrole mléčné užítkovosti (KU; část A a B) a zajištění rutinních metod pro jejich věrohodné stanovení (část C)

A) Metaanalýza mléčných ukazatelů ketózy ve smyslu odhadu jejich prahových hodnot pro identifikaci subklinické ketózy

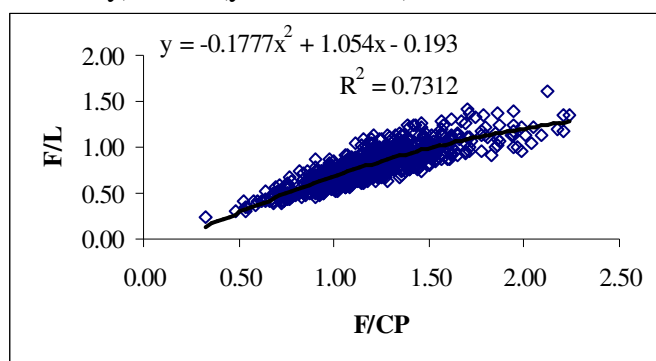
Průběžné, permanentní analýzy, tedy analýzy v reálném čase (real time), u hlavních mléčných složek a vlastností (tuk, bílkoviny, laktóza, sušina tukuprostá a počet somatických buněk) jsou nyní již v dojírnách dostupné. Pravidelná denní informace bez zpoždění je výhodná oproti měsíčnímu intervalu běžné (konvenční) kontroly užítkovosti. Farmáři tak mohou znát složení mléka každý den. Mohou proto ve svých mléčných stádech vypočítávat energetické koeficienty mléka, zkoumat a vyhledávat výskyt subklinické ketózy v časně laktaci krav a tak zlepšovat prevenci ketózy a vyvarovat se ekonomických ztrát, které jsou s ketózou spojeny. Cílem tedy bylo zlepšit věrohodnost odhadu prahových hodnot hlavních mléčných ukazatelů energetického metabolismu krav pro detekci subklinické ketózy a podporu její prevence

pomocí metaanalýzy. Také HEUER et al. (2000 b) pro své posouzení modelu pro odhad energetické bilance dojníc zčásti použili metaanalytické principy s aplikací literárních limitních hodnot ketonů a koeficientu tuk/bílkoviny v mléce. Tato metoda může mít vyšší věrohodnost výsledků než jednotlivé separátní studie. Důležité je zahrnout do kalkulace metodicky srovnatelné výsledky, tedy význam má validace vhodnosti použitých pramenů. Výsledky prací, které byly zaměřeny na zmíněný problém, byly soustředěny klasifikovány a nově statisticky vyhodnoceny. Byly to vědecké práce (viz přílohy metodiky) zaměřené na hodnocení ukazatelů ketózy v mléce (aceton (AC) a mléčné energetické koeficienty (tuk/hrubé bílkoviny, F/CP; tuk/laktóza, F/L)) a jejich prahy pro subklinickou ketózu. Byly specifikovány metody pro odvození prahových hodnot: – a) statisticky podle výsledků referenčních postupů; – b) výpočet podle principů příslušného rozdělení četností hodnot; – c) kvalifikovaný odhad podle frekvenční distribuce hodnot nebo případová studie; – d) vzájemné kombinace předchozích zmíněných postupů. Tato klasifikace byla použita jako váha pro data (w: a = 3, b = 1, c = 2, d = 2). Pro hodnocení dat byla použita přizpůsobená metoda metaanalýzy. Odlehlé hodnoty byly vyřazeny z datového souboru na základě Grubbsova testu odlehlosti (5 %; Tab. 3). Variabilita v odborných prahových hodnotách AC pro subklinickou ketózu byla vysoká (78,5 %; Tab. 3). Je možné přijmout hodnotu 10,57 mg.l⁻¹ jako validovaný odhad prahové hodnoty AC (geometrický průměr) pro identifikaci subklinické ketózy (Tab. 4). Zatímco odborná variabilita ve vědeckých odhadech prahů AC byla vysoká, variabilita prahů ketózních mléčných koeficientů byla nízká (od 5 do 8 %). Tato skutečnost ukazuje na specifickou a vědecké obtížnou definici subklinické ketózy. Je možné přijmout hodnoty mléčných koeficientů F/CP a F/L 1,276 a 0,82 (Tab. 3) jako validované odhady prahů pro identifikaci subklinické ketózy. Protože je vztah F/CP F/L těsnější v první třetině laktace (0,89; P < 0,001; Obr. 4), než v celé laktaci (0,86; P < 0,001; Obr. 4), mohla by být tato skutečnost dokladem schopnosti pro identifikaci subklinické ketózy, protože většina případů subklinických ketóz se vyskytuje v časně laktaci. Tyto výsledky byly dosaženy u: individuálních vzorků mléka; dojníc na první laktaci a ostatních laktacích prostých klinické a drsnější subklinické mastitidy; plemen České strakaté, Czech Fleckvieh (CF) a Holštýn, Holstein (H); 3 stád CF, 3 stád H a 1 stáda CF a H; letní a zimní sezóny. Dále u n = 960 (celá laktace) a 329 (první třetina laktace), kde průměrná dojivost kolísala v oboru od 5500 do 10000 kg za laktaci.

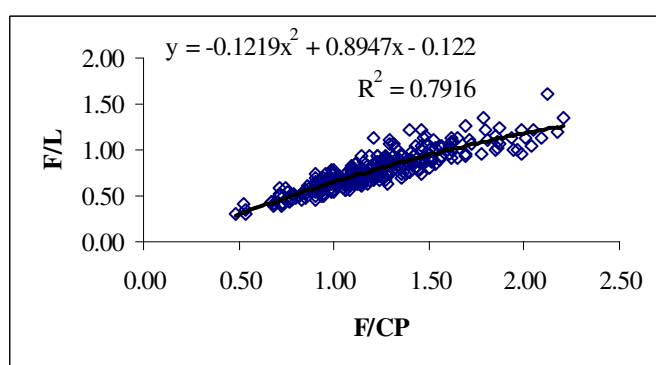
Závěr:

- zlepšené odhady prahů studovaných mléčných ukazatelů pro subklinickou ketózu v časně laktaci pomocí metaanalýzy mohou být použity v technologických inovacích (kontrola mléčné užitkovosti a real time měřicí systémy) v živočišné výrobě;
- také kombinované použití obou koeficientů (F/CP a F/L) by mohlo přinést zlepšení pravidelné diagnózy subklinické ketózy.

Obr. 4 Nelineární vztahy mezi mléčnými energetickými koeficienty F/CP (x axis, tuk/hrubé bílkoviny) a F/L (y, tuk/laktóza) během celé laktace a v první třetině laktace



$r = 0,8551$ $n = 960$



$r = 0,8897$ $n = 329$

Tab. 3 Výsledky metaanalýzy výsledků jednotlivých studií o mléčných ukazatelích ketózy (aceton (AC) a energetické koeficienty (F/CP, tuk/ hrubé bílkoviny a F/L, tuk/laktóza)) a odhad jejich validovaných prahů pro možnost vyšetřit identifikovat subklinickou ketózu dojníc

M	T	M	$x \pm sd$	vx	NG	$x \pm sd$	vx	CI	V
AC	s	19	$14,6 \pm 11,4$	78,1	19	$14,6 \pm 11,4$	78,1	18,7	–
AC	w	47	$14,4 \pm 11,3$	78,5	47	$14,4 \pm 11,3$	78,5	18,5	–
F/CP	s	8	$1,396 \pm 0,071$	5,1	8	$1,396 \pm 0,071$	5,1	0,116	1,28
F/CP	w	16	$1,391 \pm 0,07$	5,0	16	$1,391 \pm 0,07$	5,0	0,115	1,276
F/L	s	4	$0,938 \pm 0,075$	8,0	4	$0,938 \pm 0,075$	8,0	0,123	0,815
F/L	w	11	$0,932 \pm 0,068$	7,3	11	$0,932 \pm 0,068$	7,3	0,112	0,82

Mléčný aceton, AC v mg.l^{-1} ; n = počet případů; CI = interval spolehlivosti (95%) $sd \times 1,64$, jednostranné omezení; vx = variační koeficient v %; M = mléčný ukazatel; T = typ hodnocení; s = prostý; w = vážený; N = původní n; NG = n po Grubbsově testu odlehlosti; V = validovaný odhad prahu, $x - CI$.

Tab. 4 Výsledky metaanalýzy výsledků jednotlivých studií o mléčném acetonu (AC, ve formě log AC) a odhad jeho validovaného limitu pro možnost identifikovat subklinickou ketózu dojníc

Mléčný ukazatel	Typ hodnocení	n	$x \pm sd$ log AC	AC xg jako validovaný odhad prahu
AC	Prostý	19	$1,035747 \pm 0,357972$	10,86
AC	Vážený	47	$1,024048 \pm 0,361384$	10,57

Mléčný aceton, AC v mg.l^{-1} ; n = počet případů; xg = geometrický průměr.

B) Křížová validace odhadů prahových hodnot pro mléčné ukazatele subklinické ketózy

Analýzy hlavních složek mléka a vlastností mléka (tuk, bílkoviny, laktóza sušina tukuprostá a počet somatických buněk) průběžně v čase (real time analyses) jsou dnes již dostupné v moderních dojírnách. Pravidelná denní informace bez dřívějšího časového prodloužení je výhodná při srovnání k měsíčním intervalům běžné kontroly užitkovosti s ohledem na možnost flexibility ve startu nápravných opatření. Tímto způsobem mohou chovatelé znát pravidelně složení mléka. Energetické (ketózní) mléčné koeficienty jako tuk/ hrubé bílkoviny (F/CP) a tuk/laktóza (F/L) mohou být významné pro prevenci ketózy a ztrát na mléce, které jsou s ní spojeny. Cílem bylo provést reciprokou validaci věrohodnosti mléčných ukazatelů pro identifikaci subklinické ketózy (SK, viz přílohy metodiky). Byly použity: výsledky prvoteků a krav na vyšší laktaci, které byly prosté závažnějších případů subklinické mastitidy; 3 stáda českého strakatého skotu (CF), 3 stáda Holštýna (H) a jedno stádo CF a H; 329 individuálních vzorků mléka z letní a zimní sezóny a první třetiny laktace. Průměrná dojivost činila od 5 500 do 10 000 kg mléka za laktaci. Prahy F/CP a F/L byly odhadnuty ($P < 0,05$) podle prahu acetonu pro subklinickou ketózu (Obr. 5; $\geq 10 \text{ mg.l}^{-1}$). Tyto činily: pro první laktaci 1,27 (CF) a 1,32 (H), pro další laktace 1,52 (CF) a 1,42 (H) u F/CP; pro první laktaci 0,84 (CF) a 0,84 (H), pro další laktace 0,87 (CF) a 0,85 (H) u F/L (Tab. 5, A). Následně byly tyto použity pro křížovou validaci pomocí vzájemně reciproké kalkulace podle relevantních rovnic ($P < 0,001$): pro první laktaci 1,251 (CF) a 1,31 (H), pro další laktace 1,31 (CF) a 1,383 (H) u F/CP; pro první laktaci 0,831 (CF) a 0,821 (H), pro další laktace 0,989 (CF) a 0,852 (H) u F/L (Tab. 5, B; Obr. 6). Tyto validací, křížovým recipročním výpočtem, odhadnuté prahové hodnoty jsou dost podobné jejich původním hodnotám (Tab. 5). To potvrzuje dobrou věrohodnost původních odhadů prahových hodnot. Validované odhady prahových hodnot studovaných mléčných ukazatelů (F/CP a F/L) pro subklinickou ketózu v časně laktaci mohou být použity v technologických inovacích (kontrola mléčné užitkovosti a v měřicích systémech s principem real time) v moderní živočišné výrobě. Také kombinované použití prahových hodnot obou koeficientů (F/CP a F/L) by mohlo zlepšit pravidelné výsledky vyšetření na subklinickou ketózu v praxi.

Závěr:

- metody analýzy real time (pravidelné v daném čase) u hlavních mléčných složek (tuk, bílkoviny, laktóza) a počtu somatických buněk jsou zavedeny do praxe dojení v moderních dojírnách. Tímto způsobem mohou chovatelé docílit pravidelně znalosti o složení mléka. Proto mohou zkoumat a identifikovat výskyt subklinické ketózy u krav v důsledku použití mléčných koeficientů a tak řídit prevenci ketózy. Uvedené může ochránit ekonomiku farmy před případnými ztrátami;

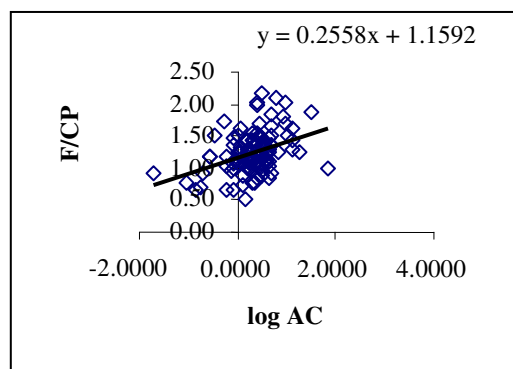
- vyšší operační aktivita takového systému je výhodná. Zde validované odhady prahových hodnot (1. laktace 1,251 (CF) a 1,31 (H), další laktace 1,31 (CF) a 1,383 (H) u F/CP; 0,831 (CF) a 0,821 (H), 0,989 (CF) a 0,852 (H) u F/L) mléčných ukazatelů pro subklinickou ketózu v časně laktaci tak mohou být použity pro zlepšení ekonomiky živočišné výroby;
- kombinované použití obou koeficientů může být efektivnější v pravidelné diagnóze subklinické ketózy.

Tab. 5 Výsledky reciprokého odhadu prahových hodnot pro mléčné ukazatele jako F/CP (tuk/hrubé bílkoviny) a F/L (tuk/laktóza) pro účely diagnózy subklinické ketózy dojníc v první třetině laktace

Mléčný ukazatel	Předchozí práh (A)	Specifikace	Validace odhadu prahové hodnoty (B)
F/CP	1,27	CF 1. laktace	0,831 F/L
	1,32	H 1. laktace	0,821 F/L
	1,52	CF ostatní laktace	0,989 F/L
	1,42	H ostatní laktace	0,852 F/L
F/L	0,84	CF 1. laktace	1,251 F/CP
	0,84	H 1. laktace	1,31 F/CP
	0,87	CF ostatní laktace	1,31 F/CP
	0,85	H ostatní laktace	1,383 F/CP

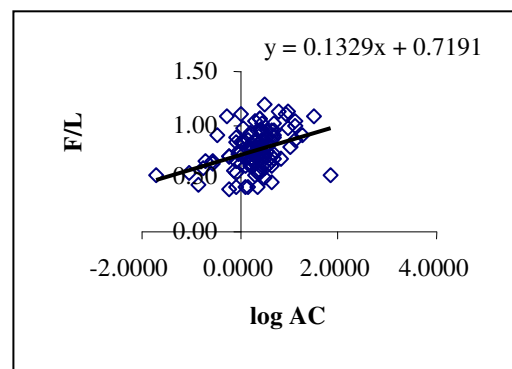
A = podle dřívějších rovnic (10 mg.l^{-1}); B = podle validačních rovnic s ohledem na hodnotu A.

Obr. 5 Regresní vztahy mezi log AC a mléčnými ketózními koeficienty F/CP a F/L pro holštýnské plemeno a ostatní laktace (druhá a vyšší) v 1. třetině laktace ($P < 0,05$)



$R^2 = 0,1512$

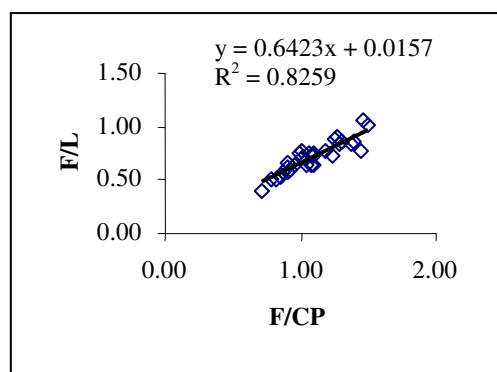
$r = 0,3888$



$R^2 = 0,1289$

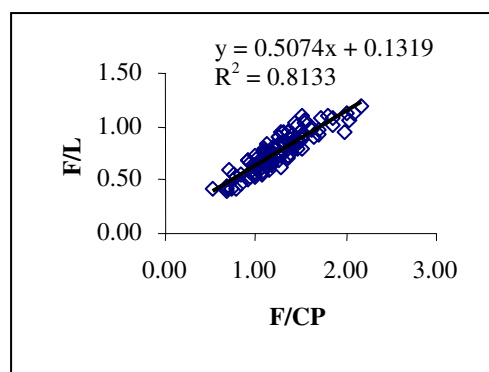
$r = 0,359$

Obr. 6 Vztahy mezi mléčnými ketózními koeficienty F/CP a F/L pro dojnice českého strakatého skotu (CF) na 1. laktaci a holštýnského plemene (H) na dalších laktacích v 1. třetině laktace ($P < 0,001$)



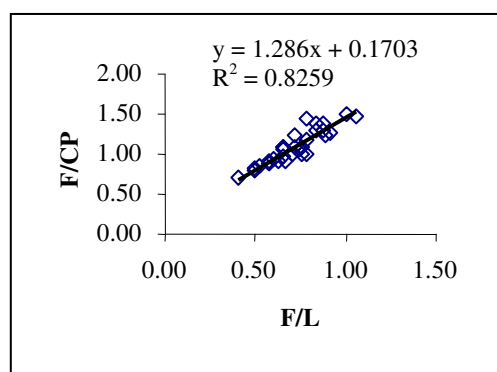
CF; $R^2 = 0,8259$

$r = 0,9088$



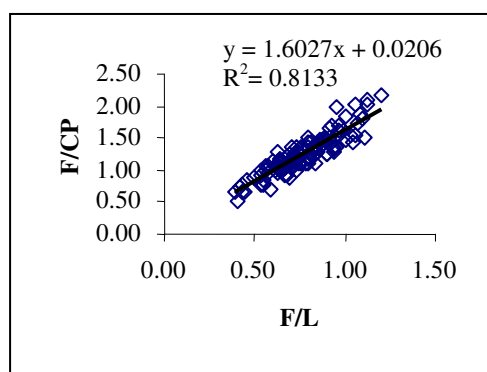
H; $R^2 = 0,8133$

$r = 0,9018$



CF; $R^2 = 0,8259$

$r = 0,9088$



H; $R^2 = 0,8133$

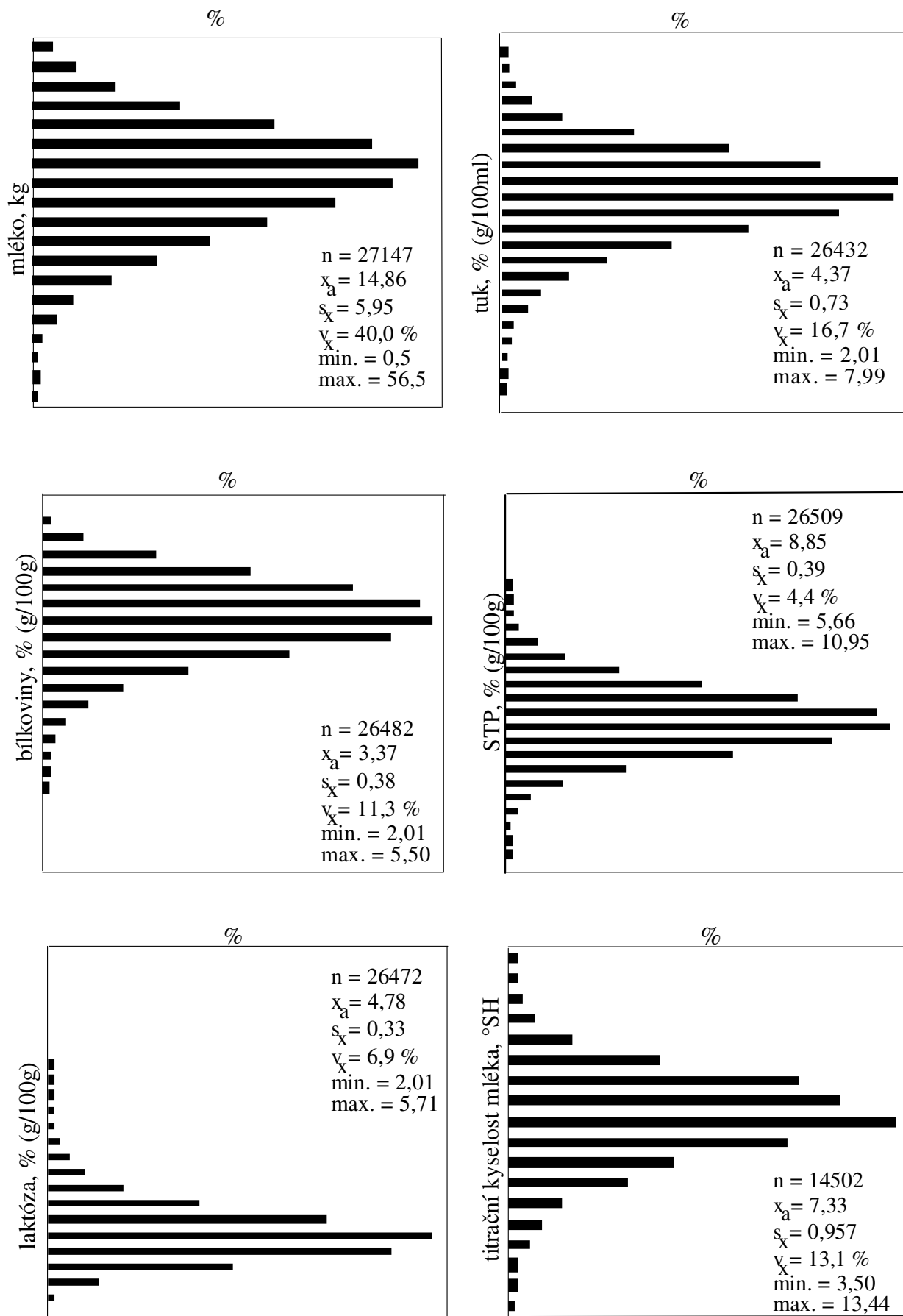
$r = 0,9018$

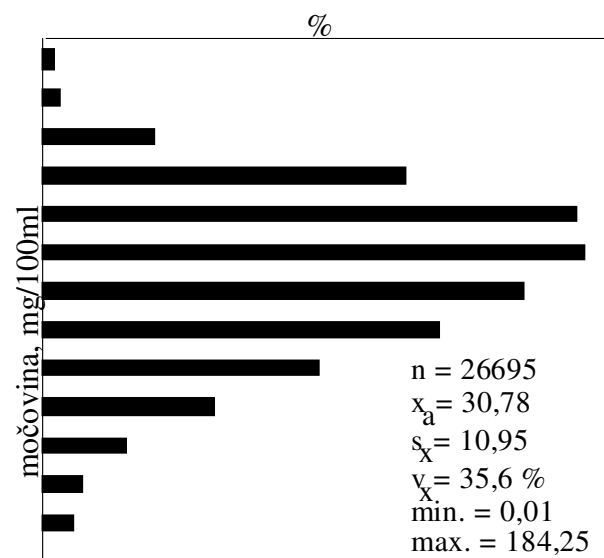
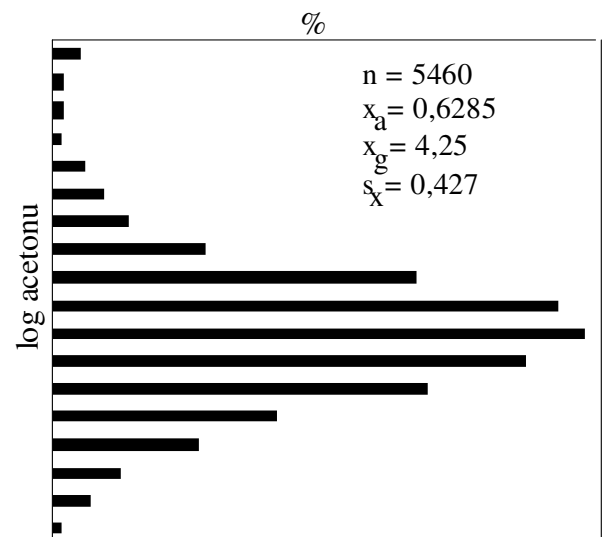
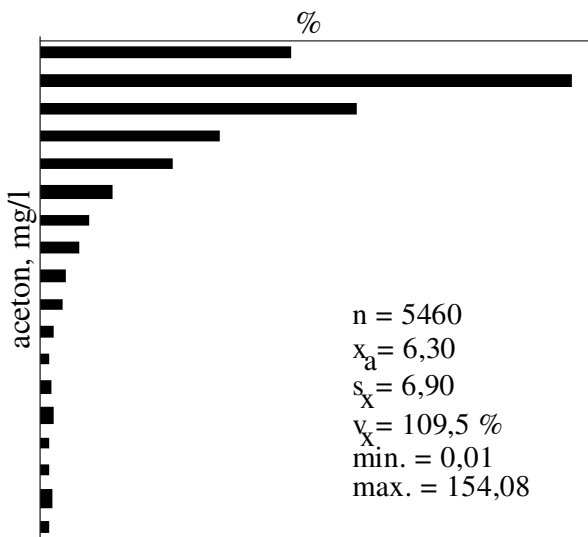
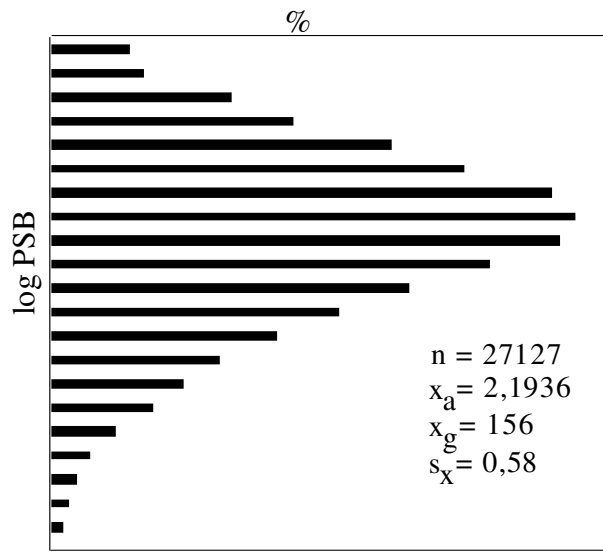
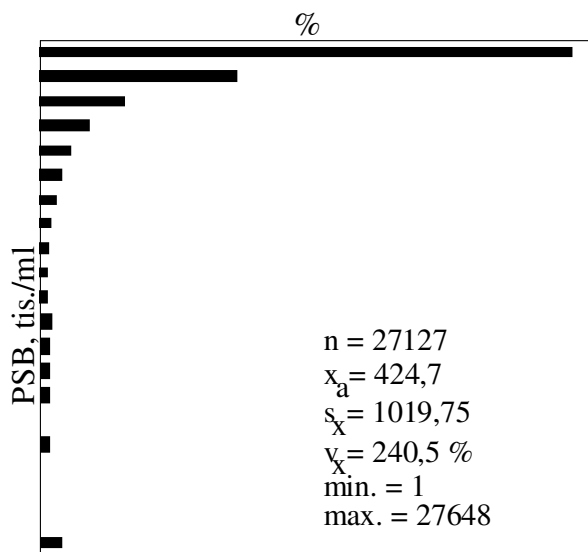
C) Potvrzení možnosti aplikace metody MIR-FT k detekci ketonů v mléce v kontrole užítkovosti

1 - Referenční a nepřímé analýzy ketonů (acetonu) v mléce

Referenčně byl aceton (AC) stanoven pomocí spektrofotometrického měření při vlnové délce 485 nm na zařízení Spekol 11 (Carl Zeiss Jena, Germany). AC byl absorbován v alkalickém roztoku KOH se salicylaldehydem (O'MOORE, 1949; VOJTÍŠEK, 1986; VOJTÍŠEK et al., 1991). Po mikrodifúzi (24 hodin) ve specifických hermeticky uzavřených nádobách v temnu za teploty 25 °C byl Spekol kalibrován na referenční škále v oboru obsahu AC od 1 do 20 mg.l⁻¹. Metoda byla určující ke stanovení referenčních hodnot (2011). Jako nepřímá kalibrovaná metoda byla použita metoda MIR-FT (mid infrared, středová infračervená spektroskopie s Fourierovými transformacemi): Lactoscope FT-IR (Delta Instruments, Holandsko); MilkoScan FT 6000 (M-Sc; Foss Electric, Dánsko). Nepřímé metody jsou lokalizovány v mléčných laboratořích kontroly užítkovosti Českomoravské společnosti chovatelů a.s. Praha.

Obr. 7 Příklad frekvenční distribuce hodnot mléčného AC v individuálních vzorcích z KU (HANUŠ et al., 2001 a)



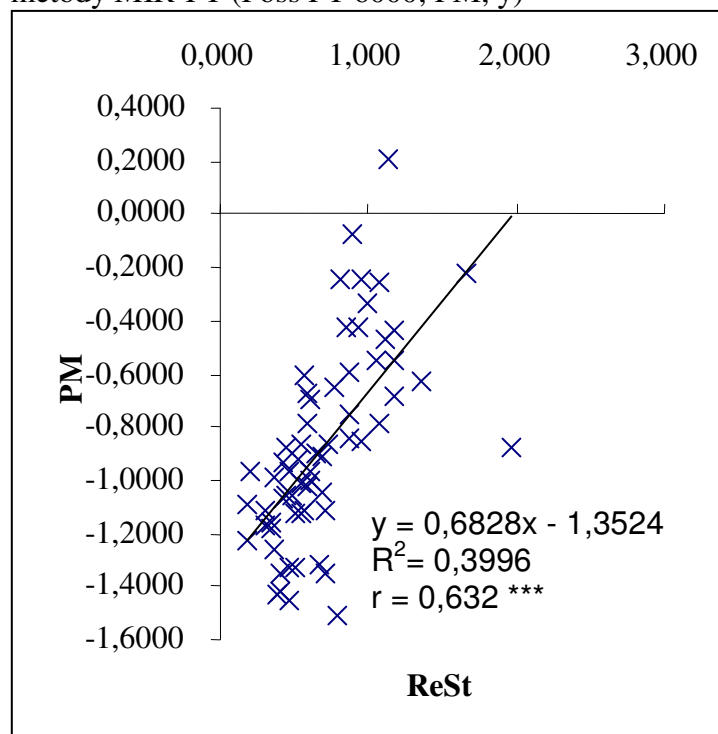


(n = počet případů; x_a = aritmetický průměr; x_g = geometrický průměr; s_x = směrodatná odchylka; v_x = variační koeficient; min. = minimální hodnota; max. = maximální hodnota)

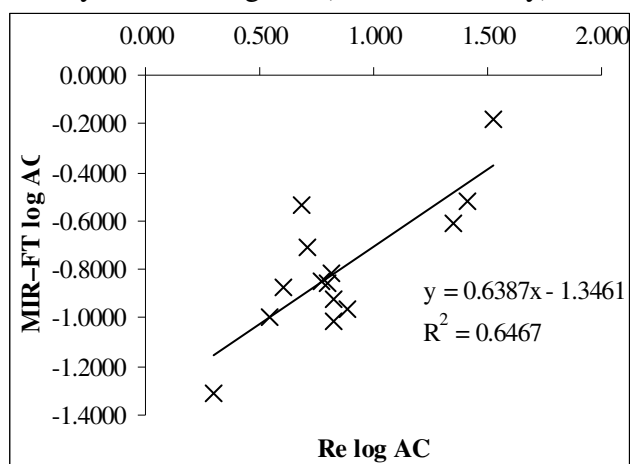
Z důvodu absence normální frekvenční distribuce u AC v individuálních vzorcích mléka (viz dřívější výzkumy; HANUŠ et al., 1999, 2001 a, c; Obr. 7) byly hodnoty mléčného AC použity v původních hodnotách (mg.l^{-1}) a dále po logaritmické transformaci. Podobně se chová jako ukazatel např. počet somatických buněk, zatímco dojivost a základní složkové ukazatele, jako tuk, bílkoviny, laktóza, sušina tukuprostá a také močovina, vykazují frekvenční distribuci blízkou normální ve smyslu platnosti Gaussova modelu. Je to důvod, proč byly dále hodnoty mléčných ketózních koeficientů kalkulovány z původních hodnot, tedy bez nezbytných transformací dat. U AC byl transformační postup zvolen pro možnost věrohodného vyhodnocení spolehlivosti nepřímo měřených hodnot (MELOUN a MILITKÝ, 1992, 1994; HANUŠ et al., 2001 a, b).

Vedle dřívějších kalibrací byla provedena doposud nejrozsáhlejší pilotní akce (2011, $n = 64$) s následujícími výsledky: regresní lineární vztah mezi referenčními a nepřímými (MIR-FT) hodnotami log AC ukázal na významný ($P < 0,001$) kalibrační korelační koeficient 0,63 (Obr. 8; $n = 64$). Jedná se zatím o jednu z nejvyšších dosažených hodnot těsnosti uvedeného vztahu v České republice ($0,63 < 0,8$; HANUŠ et al., 2011 a; Obr. 9, $P < 0,001$, ale byly dosaženy rovněž těsnosti 0,589 Obr. 10, $P < 0,001$ a samozřejmě i nižší). Větší těsnosti korelace vztahu moho být dosaženo zpravidla vyšším zsatoupením hodnot s vyššími obsahy AC v kalibrační sadě, které byly přirozené, i když patologické, tedy bez umělých přísad AC, způsobené reálnou ketózou, se všemi jejími dalšími průvodními dopady do mléka, což je obvykle praktickým problémem procesu. V uvedených případech tomu tak bylo na rozdíl od méně úspěšných dřívějších kalibrací.

Obr. 8 Regresní lineární vztah mezi referenčními hodnotami log AC (ReSt; x) a výsledky metody MIR-FT (Foss FT 6000; PM, y)



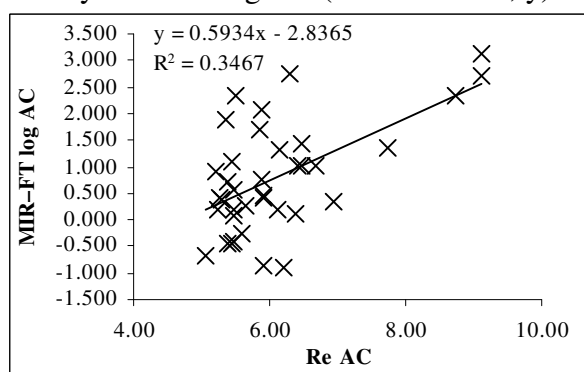
Obr. 9 Regresní lineární vztah mezi referenčními hodnotami Re log AC (x) a výsledky metody MIR-FT log AC (Foss FT 6000; y)



$r = 0,804$ ***

$n = 14$

Obr. 10 Regresní lineární vztah mezi referenčními hodnotami Re AC (x, v mg.l^{-1}) a výsledky metody MIR-FT log AC (Foss FT 6000; y)



$r = 0,589$ ***

$n = 37$

Závěr:

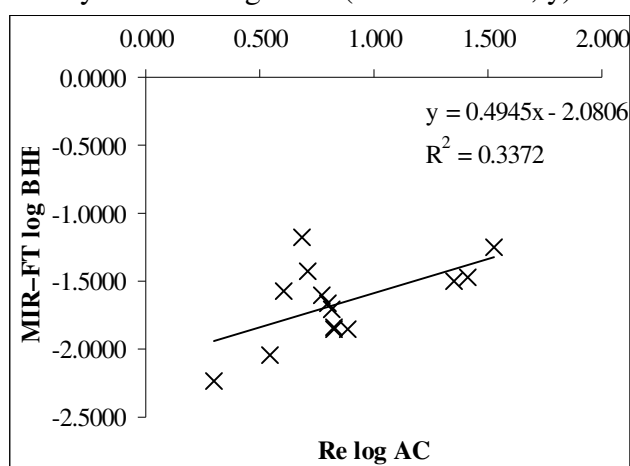
- těsnost korelačního koeficientu (0,63) mezi referenčními hodnotami a hodnotami stanovení log AC nepřímou metodou MIR-FT je v posledním pilotním kalibračním testu přijatelná s ohledem na známé obtíže multikomponentního stanovení minoritních složek mléka fyzikálním potupem v prostředí komplikovaném s ohledem na pozadí měření;
- uvedený výsledek tak již opravňuje použít tyto nepřímé postupy v praxi KU jako screeningové monitorovací testy.

2 - Metaanalytické odvození limitů AC a BHB pro MIR-FT

Otázkou z analytického hlediska zde zůstává jen přepočtené a pro praxi přijatelné vyjadřování výsledků v dohodnutých jednotkách (interpretace jednotek koncentrace). Přepočet limitu $> 10 \text{ mg.l}^{-1}$ z vybraných vztahů (HANUŠ et al., 2011 d) výsledků AC v mléce referenční metodou na log AC a log BHB pomocí MIR-FT by mohl činit $> -0,80$ a $> -1,66$ z hlediska interpretace diskriminační limitní hodnoty problému ketóz s interpretací – podezření na subklinickou ketózu.

Korelační koeficient mezi referenčními hodnotami AC a přístrojovými log BHB činil např. 0,581, Obr. 11, $P < 0,001$, při pilotních kalibracích. Podobně byl korelační koeficient mezi přístrojovými (MIR-FT) hodnotami log AC a log BHB 0,893, Obr. 12, $P < 0,001$, v souboru individuálních vzorků mléka. To je logické ve vztahu k dynamice ketózy u zvířete, např. podle uvedeného schématu (Obr. 3). Uvedené znamená, že 81,2 % výsledkové variability v log BHB je vysvětlitelných variabilitou přístrojových výsledků v log AC. Zmíněné skutečnosti umožnily provést předchozí uvedený praktický metaanalytický odhad prahových hodnot log AC a log BHB (MIR-FT) pro subklinickou ketózu.

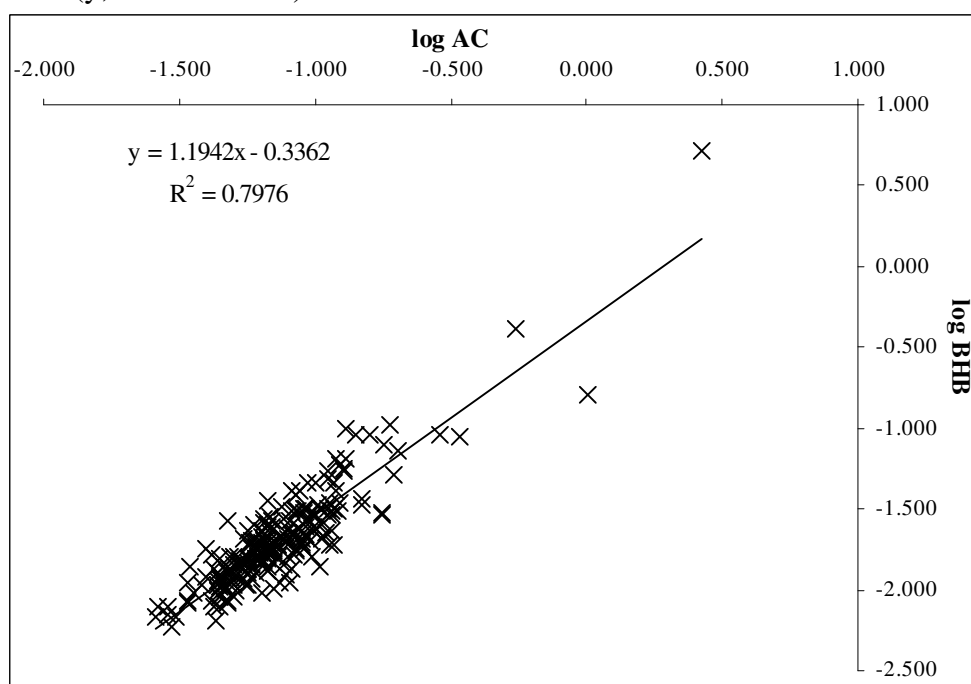
Obr. 11 Regresní lineární vztah mezi referenčními hodnotami Re log AC (x) a výsledky metody MIR-FT log BHB (Foss FT 6000; y)



$r = 0,581 ***$

$n = 14$

Obr. 12 Regresní lineární vztah mezi přístrojovými (MIR-FT) hodnotami log AC (x) a log BHB (y; Foss FT 6000)



$r = 0,893***$

$n = 224$

Závěr:

- výsledky lze označit za slibné pro monitoring ketóz u individuálních vzorků mléka z kontroly užítkovosti;
- vhodným sestavením kalibrační sady a také vhodnými transformacemi hodnot stejně jako účelným výběrem z nabídky možných kombinací uvedených variant se jeví jako reálné docílit prakticky použitelné výsledky v monitoringu ketóz.

4) Interpretace výsledků mléčných ukazatelů v kontrole užítkovosti pro praktické možnosti řízení prevence ketóz, podporu zdraví zvířat a kvality, resp. technologické způsobilosti, syrového mléka – vlastní metodika (variantní algoritmové podklady)

Na základě výše uvedených faktů prezentuje vlastní metodika jako variantní návod a vymezení podmínek, resp. algoritmus, pro tvorbu aplikovaného software v kontrole mléčné užítkovosti ke zlepšení prevence subklinické ketózy v chovu dojnic:

1) – do popsaného postupu identifikace subklinické ketózy budou v KU zahrnuta všechna stáda (stáje, základní srovnávací jednotkou pro identifikace a výpočty je zde stáj s ohledem na jistou vyrovnanost výživy této jednotky) dojnic plemen H a CF (A), nebo vybraná stáda plemen H a CF (B) a to podle průměrné dojivosti za normovanou laktaci v předchozím kontrolním roce, kdy půjde o stáda nadprůměrná, nebo stáda z horního 33 percentilu (volba může záviset na komercializaci služby, kdy bude li tato bezplatná, lze počítat s řešením A, při jistém zpoplatnění lze předpokládat variantu B);

2) – vlastní hodnocení pak bude probíhat na úrovni výsledků jednotlivých zvířat v KU;

3) – s ohledem na faktor laktace budou zahrnuty do hodnocení SK všechny laktace, ale s ohledem na stadium pouze vzorky mléka z KU do 100 dní laktace;

4) – v takto selektované skupině zvířat mohou být na pravděpodobný výskyt SK hodnocena všechna relevantní zvířata, nebo jen krávy s vyšší denní dojivostí než byl aritmetický průměr stejné skupiny (do 100 dní laktace v daném stádě) v předchozím termínu KU;

5) – jednohvězdičkovou identifikací (□) bude v protokolu u výsledku (dojnice, rozboru) v kontrole užítkovosti (KU) vyjádřeno podezření na pravděpodobný výskyt subklinické ketózy (SK) při výsledku metody MIR-FT pro beta hydroxybutyrát v mléce když $\log \text{BHB}$ bude $\geq -1,66$;

6) – jednohvězdičkovou identifikací (□) bude v protokolu u výsledku (dojnice, rozboru) v KU vyjádřeno podezření na pravděpodobný výskyt SK při výsledku aktuálního koeficientu tuk/bílkoviny v mléce $\geq 1,25$ (v případě genotypu jedince H $\geq 50 \%$) $\geq 1,35$ (v případě genotypu jedince CF $> 50 \%$);

7) – jednohvězdičkovou identifikací (□) bude v protokolu u výsledku v KU vyjádřeno podezření na pravděpodobný výskyt SK při výsledku aktuálního koeficientu tuk/laktóza v mléce $\geq 0,8$ (v případě genotypu jedince H $\geq 50 \%$) $\geq 0,9$ (v případě genotypu jedince CF $> 50 \%$);

8) – dvouhvězdičkovou identifikací (□ □ □ □) bude v protokolu u výsledku v KU vyjádřeno podezření na pravděpodobný výskyt SK při výsledku acetonu v mléce $\geq 10 \text{ mg.l}^{-1}$ nebo metody MIR–FT pro aceton v mléce když $\log AC$ bude $\geq -0,8$;

9) – závažnost podezření na výskyt SK u dojnice bude tedy vzrůstat s počtem identifikačních znamének, kterých může být takto až 5;

10) – na spodní části protokolu bude uvedena hodnota výpočtu frekvence výskytu podezření na SK ve stádě podle intenzity onemocnění (I) jako % výskytu počtu znamének (□) z počtu zvířat do 100 dnů laktace (100 %) v daném měsíci a stádě;

11) – na spodní části protokolu bude dále uvedena také hodnota výpočtu frekvence výskytu podezření na SK ve stádě podle počtu případů (II) jako % výskytu počtu znamének případů podezření na SK z počtu zvířat do 100 dnů laktace (100 %) v daném měsíci a stádě;

12) – k předchozím dvěma tučně uvedeným údajům z aktuálního měsíce (body 10 a 11, varianty I a II) budou na spodní části protokolu uvedeny běžným písmem korespondující hodnoty z předchozích tří měsíců KU stáda tak, aby bylo možné porovnat trend ve vývoji ketózní situace konkrétního stáda (stáje) dojnic pro poradenské účely;

13) – pro interpretaci k poradenským účelům ve stádě (stáji) dojnic, k podpoře zdraví zvířat a kvality mléka, bude možné na spodní části protokolu KU vybrat interpretaci výsledků ketózního stavu dojnic a stáda podle výskytu hvězdičkových označení (1 až 5) v Tab. 6;

14) – přiřazení interpretací k výskytu SK do protokolu bude provedeno podle počtu hvězdičkových identifikací v hlavičce (řádek Diagnóza) Tab. 6;

15) – výsledky mohou být pro chovatele dostupné přes internet a hesla podle chovů na portálu KU nebo podle zkušenosti (podle vývoje hodnot frekvence výskytu v dolní části protokolu – při postupně zvolených limitech), při vyšším výskytu SK, by mohlo na chov být odesláno vhodnou efektivní cestou bezodkladně varovné sdělení ohledně rizik SK.

Tab. 6 Tabulka možných variant interpretace ketózního stavu (subklinických ketóz a klinické ketózy) podle ukazatelů v mléce s indikací závažnosti stavu ve vazbě na možné výsledky indikace ketózy z kontroly užitkovosti (předmět a výstup této certifikované metodiky RO0513 CM 24) a s náznakem směru možných řešení (s ohledem na Obr. 3)

Diagnostické indikační hodnoty acetonu v mléce (mg/l):

konzervované objemné krmivo (zimní, případně i letní sezóna) -	< 7	7 až 10	> 10 až 20	> 20 až 35	> 35
zelený pás krmení (letní sezóna) -	< 5	5 až 8	> 8 až 15	> 15 až 30	> 30

Interpretace:

Diagnóza	zdravá dojnice	možný nástup subklinické ketózy 1 □	méně závažná subklinická ketóza 2 □	závažná subklinická ketóza 3 □	možnost klinické ketózy 4 □ a 5 □
rizika přímá i nepřímá	—	vznik ketózy	zhoršení plodnosti	zhoršení plodnosti a dojivosti, posunutí slezu, acidóza, jaterní steatóza, imunosuprese a mastitidy	zhoršení plodnosti, dojivosti i kvality mléka, posunutí slezu, acidóza, jaterní steatóza, imunosuprese a mastitidy
průvodní jevy a příznaky	—	—	snížení příjmu krmiva, zvýšení tuku v mléce, ztráta kondice	snížení příjmu krmiva, zvýšení tuku v mléce, ztráta kondice	snížení příjmu krmiva, pokles dojivosti, zvýšení tuku v mléce, větší ztráta kondice
klinické příznaky					zvíře uléhá, trpí nechutenstvím, ubývá na hmotnosti, je dehydratované, srst ztrácí lesk, pach dechu po acetonu, zvíře může v těžších případech i uhynout

Rámcová preventivní a léčebná opatření:

—	preventivně zabránit ztučnění před porodem	preventivně zabránit ztučnění před porodem, zvýšení přívodu energie v krmení, preventivní zkrmení propylenglykolu	preventivně zabránit ztučnění před porodem, léčebné podání propylenglykolu, použití hepatoprotektivních preparátů	preventivně zabránit ztučnění před porodem, léčebné podání propylenglykolu, použití hepatoprotektivních preparátů, léčebná nitrožilní a podkožní aplikace glukózy a inzulínu, atp.
---	--	---	---	--

5) Závěr certifikované metodiky

Dobré zdraví dojnic je pro kvalitu mléka, efektivitu chovu a podporu bezpečnosti potravinového řetězce stále důležitější. V mléce je řada složek, podle kterých lze metodou neinvazivního monitoringu kontrolovat zdravotní stav krav. Na vyváženost energetického metabolismu mohou poukazovat, při zohlednění plemene, dojivosti a stadia laktace, kombinace mléčných makrosložek – tuku, bílkovin a laktózy. Důležité jsou také složky minoritní, metabolity s úzkou vazbou na výživový stav dojnic, zejména ketony. Mléko, na rozdíl od krve nebo moče, zajišťuje snadný odběr vzorků.

Výsledky systému klasické kontroly mléčné užitkovosti nebo real-time analýzy v individuálních vzorcích mléka jsou vhodné pro systémové řešení indikace ketózy v praxi chovu dojnic. Výsledky indikace lze využít k výběru praktických opatření léčby nebo prevence ketózy. Certifikovaná metodika poskytuje zdůvodnění a podklady, resp. algoritmus, pro tvorbu aplikovaného software v KU k plnění výše zmíněného zadání.

III) Srovnání „novosti postupů“ a předání certifikované metodiky: Identifikace subklinické ketózy krav v časně laktaci podle výsledků dojivosti a individuálních vzorků mléka v kontrole užitkovosti a interpretace výsledků:

- vyvinutá certifikovaná metodika byla předána do užívání systému kontroly mléčné užitkovosti ČMSCH a. s. v elektronické i písemné formě 15. 11. 2013;
- jedná se o nový postup interpretace výsledků kontroly užitkovosti, tedy analytických výsledků majoritních a minoritních složek individuálních vzorků mléka. Tato skutečnost je doložena příloženými vlastními publikovanými výsledky. Uvedené postupy interpretace jsou v kontrole užitkovosti České republiky používány nyní krátce v souvislosti s vývojem této metodiky, právě v souvislosti s vývojem analytických metodik, a až doposud nebyly v podstatě používány.

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

- kontrola existence a aplikace certifikované uplatněné metodiky jako pracovního postupu pro efektivní interpretaci dat z kontroly užitkovosti (KU - ČMSCH a.s., Praha) v časně laktaci k identifikaci a řízení prevence subklinické ketózy (na mléčných farmách) je proveditelná, prostřednictvím revize dokladů a dokumentů o cíleném poradenství ČMSCH v mléčných chovech prostřednictvím distribuce související výsledkové dokumentace KU, především u ČMSCH a.s. a případně ve vázaných mléčných laboratořích KU (LRM Buštěhrad a LRM Brno-Tuřany).
- certifikovaná uplatněná metodika obsahuje technicko-organizační doporučení, opatření a postupy identifikace výskytu subklinické ketózy dojnic a relevantní interpretace výsledků v prevenci v rámci kontroly mléčné užitkovosti;
- certifikovaná uplatněná metodika byla zpracována v šesti exemplářích a předána v kroužkové vazbě na příslušná pracoviště.

V) Ekonomické aspekty

Ekonomický dopad je součástí kontroly zdravotního (výživy a reprodukce) stavu dojnic, prevenční práce s ohledem na rizika v chovu dojeného skotu a poradenství ke kvalitě mléka. Zlepšení prevence ketózy zde může tvořit podíl do 5 % efektu ve smyslu zajištění zlepšeného zdravotního stavu krav, tedy redukce běžných ztrát způsobených produkčními

chorobami, které mohou tvořit podle odhadů značné obchodní ztráty. Objem případných ztrát z produkčních poruch za rok v České republice lze vyčíslit na min. 140 000 000 l mléka (z toho 5 % odhadnutého efektu zlepšení činí cca 56 mil. Kč při farmářské ceně 8 Kč za 1 litr mléka).

Náklady na konkrétní zavedení postupu uvedeného v metodice mohou pro uživatele (ČMSCH) činit podle kvalifikovaného odhadu v ČR celkem 90 tis. Kč (mzdy a poplatky za služby, popř. relevantní hardware, za doplňky softwarového vybavení KU) jednorázově. Činnost se periodicky aktualizuje (měsíčně). Přínos pro uživatele (ČMSCH) v podobě dodatečných tržeb, za rozšíření spektra a počtu analýz v KU, za provedení rutinní screening-poradenství, podle smluv, by mohl činit, podle kvalifikovaného odhadu, cca 300 tis. Kč ročně (cca 150 tis Kč ročně na 1 laboratoř). Efekt je opakovatelný po rocích a celkový možný přínos za redukcí ztrát na doživosti a léčbě, v nadprůměrných mlékařských chovech v ČR, je odhadnut již výše na cca 56 mil. Kč ročně.

VI) Seznam použité související literatury

6) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky

- AGABRIEL, C.- COULON, J. B.- MARTHY, G.- CHENEAU, N.: Facteurs de variation du taux protéique du lait de vache. INRA Product. Anim., 3, 2, 1990, 137-150.
- AGABRIEL, C.- COULON, J. B.- MARTHY, G.: Facteurs de variations du rapport des teneurs en matières grasses et protéiques du lait de vache. INRA Product. Anim., 4, 2, 1991, 141-149.
- ANDERSSON, L.: Concentrations of blood and milk ketone bodies, blood isopropanol and plasma glucose in dairy cows in relation to the degree of hyperketonaemia and clinical signs. Zbl. Vet. Med., A 31, 1984, 683-693.
- ANDERSSON, L.: Subclinical ketosis in dairy cows. Veterinary Clinical of North America: Food Animal Practice, 4, 2, 1988, 233-251.
- ANDERSSON, L.- EMANUELSON, U.: An epidemiological study of hyperketonaemia in Swedish dairy cows: determinants and the relation to fertility. Prev. Vet. Med., 3, 1985, 449.
- ANDERSSON, L.- LUNDSTRÖM, K.: Milk and blood ketone bodies, blood isopropanol and plasma glucose in dairy cows, methodical studies and diurnal variations. Zbl. Vet. Med., 31, 1984 a, 340-349.
- ANDERSSON, L.- LUNDSTRÖM, K.: Effect of energy balance on plasma glucose and ketone bodies in blood and milk and influence of hyperketonaemia on milk production of postparturient dairy cows. Zbl. Vet. Med., 31, 1984 b, 539-547.
- BERAN, J.- STÁDNÍK, L.- DUCHÁČEK, J.- OKROUHLÁ, M.: Relationships between changes in Holstein cow's body conditions, acetone and urea content in milk and cervical mucus and sperm survival. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., LX, 5, 2012, 39-48.
- BÍRO, D.- LABUDA, J.- CABADAJOVÁ, M.: Factors influencing cow milk production and fat to protein content ratio. (In Slovak) Živoč. Vyr. / Czech J. Anim. Sci., 37, 6-7, 1992, 521-528.
- BRANDT, A.- PABST, R.- SCHULTE-COERNE, H.- GRAVERT, H.O.: Die Heritabilität der Futteraufnahme bei Milchkühen. Züchtungskunde, 57, 1985, 299-308.
- CARRIER, J.- STEWART, S.- GODDEN, S.- FETROW, J.- RAPNICKI, P.: Evaluation and use of three cow-side tests for detection of subclinical ketosis in early postpartum cows. J. Dairy Sci., 87, 2004, 3725-3735.
- COSKUN, B.- INAL, F.- GÜRBÜZ, E.- POLAT, E. S.- ALATAS, M. S.: The effects of additional glycerol in different feed form on dairy cows. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 18, 1, 2012, 115-120.

- DIEKMANN, L.: Energiebilanz vor und nach dem Kalben. *Tierzüchter*, 2, 1987, 72-73.
- DRIFT VAN DER, S. G. K.- JORRITSMAN, R.- SCHONEWILLE, J. T.- KNIJN, H. M.- STEGEMAN, J. A.: Routine detection of hyperketonemia in dairy cows using Fourier transform infrared spectroscopy analysis of β -hydroxybutyrate and acetone in milk in combination with test-day information. *J. Dairy Sci.*, 95, 9, 2012, 4886-4898.
- DUFFIELD, T.: Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 16, 2000, 231-253.
- DUFFIELD, T. F.- KELTON, D. F.- LESLIE, K. E.- LISSEMORE, K. D.- LUMSDEN, J. H.: Use of test day milk fat and milk protein to detect subclinical ketosis in dairy cattle in Ontario. *Can. Vet. J.*, 38, 1997, 713-718.
- DUFFIELD, T. F.- LISSEMORE, K. D.- MC BRIDE, B. W.- LESLIE, K. E.: Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.*, 92, 2009, 571-580.
- DUCHÁČEK, J.- VACEK, M.- STÁDNÍK, L.- BERAN, J.- VODKOVÁ, Z.- ROHLÍKOVÁ, V.- NEJDLOVÁ, M.: Relationship between energy status and fertility in Czech Fleckvieh cows. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LX, 6, ISSN 1211-8516, 2012, 67-74.
- EMANUELSON, U.- ANDERSSON, L.: Genetic variation in milk acetone in Swedish dairy cows. *J. Vet. Med.*, A 33, 1986, 600-608.
- EMERY, R. S.- BURG, N.- BROWN, L. D.: Detection, occurrence and prophylactic treatment of borderline ketosis with propylene glycol feeding. *J. Dairy Sci.*, 47, 1964, 1074.
- FAMIGLI-BERGAMINI, P.: Rapporti tra patologia (non mammaria) ed aspetti quali-quantitativi del latte nella bovina. *Societa Italiana di Buiatria*, Bologna, 19, 8-10, 1987, 89-99.
- ENJALBERT, F.- NICOT, M. C.- BAYOURTHE, C.- MONCOULON, R.: Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *J. Dairy Sci.*, 84, 2001, 583-589.
- FÜLL, M.- DECKERT, W.- SCHÄFER, M.- WEHLITZ, A.: Lipolyse und Ketogenese bei Milchkühen - Beobachtungen im Laktationsverlauf. *Mh. Vet.-Med.*, 47, 1992, 119-124.
- GASTEINER, J.: Ketose, die bedeutendste Stoffwechselerkrankung der Milchkühe. In: *BAL Gumpenstein Bericht*, 27. Viehwirtschaftliche Fachtagung, Juni, 2000, 11-18.
- GASTEINER, J.: Der Einsatz glukoplastischer Verbindungen in der Milchviehfütterung. In: *BAL Gumpenstein Bericht*, 30. Viehwirtschaftliche Fachtagung, April, 2003, 61-63.
- GEISHAUSER, T.- LESLIE, K. E.- DUFFIELD, T.- EDGE, V.: An evaluation of milk ketone tests for the prediction of left displaced abomasum in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 80, 1997, 3188-3192.
- GEISHAUSER, T.- LESLIE, K. E. - DUFFIELD, T.- SANDALS, D.- EDGE, V.: The association between selected metabolic parameters and left abomasal displacement in dairy cows. *J. Vet. Med.*, A 45, 1998, 499-511.
- GEISHAUSER, T.- ZIEBELL, K. L.: Fett/Eiweiß-Quotient in der Milch von Rinderherden mit Vorkommen von Labmagenverlagerungen. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 102, 1995, 469-471.
- GRAVERT, H. O.- LANGER, R.- DIEKMANN, L.- PABST, K.- SCHULTE-COERNE, H.: Ketonkörper in Milch als Indikatoren für die Energiebilanz der Milchkühe. *Züchtungskunde*, 58, 1986, 309-318.
- GRAVERT, H. O.- JENSEN, E.- HEFAZIAN, H.- PABST, K.- SCHULTE-COERNE, H.: Umweltbedingte und genetische Einflüsse auf den Acetongehalt der Milch. *Züchtungskunde*, 63, 1, 1991, 42-50.
- GREEN, B. L.- MC BRIDGE, B. W.- SANDALS, D.- LESLIE, K. E.- BAGG, R.- DICK, P.: The impact of a Monensin controlled - release capsule on subclinical ketosis in the transition dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 83, 1999, 333-342.
- GUSTAFSSON, A. H.- EMANUELSON, U.: Milk acetone concentration as an indicator of hyperketonaemia in dairy cows: the critical value revised. *Anim. Sci.*, 63, 1996, 183-188.

- HAMANN, J.- FEHLINGS, K.: Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis des Rindes als Herdenproblem. DVG, Kiel, 1994.
- HANA, S. S.- AYIED, A. Y.- ABDULLRADA, A. J.: Effect of some environmental factors on milk acetone level and their relationship with milk yield and some contents. *Basrah J. Agric. Sci.*, 20, 2, 2007, 65-75.
- HANSEN, P. W.: Screening of dairy cows for ketosis by use of infrared spectroscopy and multivariate calibration. *J. Dairy Sci.*, 82, 1999, 2005-2010.
- HARASZTI, J.- ZÖLDAG, L.: Die diagnostische Rolle der Ketonurie in der Vorhersage von Fortpflanzungsstörungen der Kühe. *Wien Tierärztl. Mschr.*, 77, 1990, 377-380.
- HEUER, C.- LUNGE, H. J.- LUTZ, E. T. G.- SCHUKKEN, Y. H.- VAN DER MAAS, J. H.- WILMINK, H.- NOORDHUIZEN, J. P. T. M.: Determination of acetone in cow milk by Fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. *J. Dairy Sci.*, 84, 2000 a, 575-582.
- HEUER, C.- VAN STRAALLEN, W. M.- SCHUKKEN, Y. H.: Prediction of energy balance in high yielding dairy cows with test-day information. *J. Dairy Sci.*, 84, 2001, 471-481.
- HEUER, C.- VAN STRAALLEN, W. M.- SCHUKKEN, Y. H.- DIRKZWAGER, A.- NOORDHUIZEN, J. P. T. M.: Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision. *Liv. Prod. Sci.*, 65, 2000 b, 91-105.
- JAGOŠ, P.- ILLEK, J.- SUCHÝ, P.: Beziehungen zwischen Störungen im Energiestoffwechsel und der Milchezusammensetzung. *Mh. Vet.-Med.*, 46, 1991, 698-699.
- HEYDER, J.: Acetona pomáha našim chovateľom dosahovať vysokú produkciu mlieka pri zachovaní zdravia dojníc. Acetona helps our breeders to reach the high milk yield at good health of dairy cows. *Slovenský Chov*, 6, 1998, 31.
- ILLEK, J.- PECHOVÁ, A.: Poruchy metabolismu dojníc a kvalita mléka. Metabolic disorders at cows and milk quality. *Farmář*, 6, 1997, 29-30.
- HLÁSNÝ, J.: Systém v diagnostice a prevenci poruch metabolismu bílkovin a energie u dojníc při zvyšování užítkovosti i reprodukce. A system at diagnosis and prevention of protein and energy metabolic disorders of dairy cows at increasing of milk yield and reproduction. *Výzkum v chovu skotu*, 4, 1997, 11-21.
- JANUŠ, E.- BORKOWSKA, D.: Occurrence of ketone bodies in the urine of cows during the first three months after calving and their association with milk yields. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, 56, 2013, accepted, provisional pdf.
- KAUPPINEN, K.: Prevalence of bovine ketosis in relation to number and stage of lactation. *Acta vet. scand.*, 24, 1983, 349-361.
- KAUPPINEN, K.: Annual milk yield and reproductive performance of ketotic and non-ketotic dairy cows. *Zbl. Vet. Med.*, A 31, 1984, 694-704.
- KNEGSEL, VAN A. T. M.- DRIFT, VAN DER S. G. A.- HORNEMAN, M.- ROOS, DE A. P. V.- KEMP, B.- GRAAT, G. A. M.: Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 93, 2010, 3065-3069.
- KOLOUCH, F.- ČECHOVÁ, I.- REŽNICKÝ, M.- PAULOVÁ, J.: Morfologické změny při poporodní steatóze jater vysokoproduktivních dojníc ovlivněné aplikací silymarinu. The morphological changes at post-partum liver steatosis at high milk yield cows effected by administration of silymarine. *Veterinářství*, 41, 1991, 1-2, 7-9.
- KVÍZ, J.- HOFMAN, J.: Metabolický profil dojnice a analýza vzorku mléka. Metabolic profile of dairy cow and milk sample analysis. *Náš chov*, 8, 1990, 364-373.
- LESLIE, K. E.: dopisní sdělení. Letter brief communication. 1999.
- MAJEWSKA, B.- RYBCZYŃSKA, J.: Oznaczenie ciał ketonowych w postaci acetonu w osoczu, siarce i mleku u bydła. *Medycyna Weterynaryjna*, 7, 1978, 439-441.
- MÄNTYSAARI, E. A.- GRÖHN, Y. T.- QUAAS, R. L.: Clinical ketosis: Phenotypic and genetic

- correlations between occurrences and with milk yield. *J. Dairy Sci.*, 74, 1991, 3985-3993.
- MANZENREITER, H.- FÜRST-WALTL, B.- EGGER-DANNER, C.- ZOLLITSCH, W.: Zur Eignung des Gehalts an Milchinhaltsstoffen als Ketoseindikator. 40. Viehwirtschaft. Fachtag., 2013, 9-19.
- MELOUN, M.- MILITKÝ, J.: Statistical processing of experimental data by personal computer. (In Czech) Díl IIA, Pardubice, 1992, 102.
- MELOUN, M.- MILITKÝ, J.: Statistical processing of experimental data. (In Czech) Plus, ISBN 80-85297-56-6, 1994, 839
- MIETTINEN, P. V. A.: Relationship between milk acetone and milk yield in individual cows. *J. Vet. Med.*, A 41, 1994, 102-109.
- MIETTINEN, P. V. A.: Prevention of bovine ketosis with glucogenic substance and its effect on fertility in Finnish dairy cows. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 108, 1995, 14-19.
- MOTTRAM, T.: Review: Non - invasive monitoring of the metabolic and health status of dairy cows. EAAP, 47th Annual Meeting, Lillehammer, 1996, 124.
- MOTTRAM, T.- MASSON, L.: Dumb animals and smart machines: the implication of modern milking systems for integrated management of dairy cows. In: Integrated management system for livestock, occasional Publication 28, British Society of Animal Science, 2001, 77-84.
- MOTTRAM, T.- VELASCO-GARCIA, M.- BERRY, P.- RICHARDS, P.- GHESQUIERE, J.- MASSON, L.: Automatic on-line analysis of milk constituents (urea, ketones, enzymes and hormones) using biosensors. *Comp. Clin. Pathol.*, 11, 2002, 50-58.
- O'MOORE, L. B.: A quantitative diffusion method for the detection of acetone in milk. *Vet. Rec.*, 31, 1949, 457-458.
- PARKER, R.: Using body conditions scoring in dairy herd management. Factsheet, MAF Ontario, 1989.
- RAURAMAA, A.- RAJAMÄKI, S.: Urea and ketone bodies in milk during outdoor and indoor feeding periods. WAAP, Helsinki, 1988, 8, 711.
- REIST, M.- VON EUW, D.- TSCHUEMPERLIN, K.- LEUENBERGER, L.- CHILLIARD, Y.- HAMMON, H. M.- MOREL, C.- PHILIPONA, C.- ZBINDEN, Y.- KUENZI, N.- BLUM, J. W.: Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 85, 2002, 3314-3327.
- ROOS DE, A. P. W.- BIJGAART VAN DEN, H. J. C. M.- HORLYK, L.- JONG DE, G.: Screening for subclinical ketosis in dairy cattle by Fourier transform infrared spectrometry. *J. Dairy Sci.*, 90, 2007, 1761-1766.
- ŘÍHA, J.- HANUŠ, O.: The relationships between individual reproduction parameters and milk composition in first 120 lactation days. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, XLI, 4, 1999, 3-17.
- SAKAI, T.- HAYAKAWA, T.- HAMAKAWA, M.- OGURA, K.- KUBO, S.: Therapeutic effects of simultaneous use of glucose and insulin in ketotic dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 76, 1993, 109-114.
- SIEBERT, F.- PALLAUF, J.: Analyse von Ergebnissen der Milchleistungsprüfung in Hessen im Hinblick auf ein Ketoserisiko. *Züchtungskunde*, 82, 2010, 112-122.
- SCHULZ, T.: Ohne formeln und Tabellen die Leistung gesteigert. *Top Agrar* 5, 1997, 20-22.
- STEEN, A.- OSTERAS, O.- GRONSTOL, H.: Evaluation of additional acetone and urea analyses, and of the fat-lactose-quotient in cow milk samples in the herd recording system in Norway. *J. Vet. Med.*, A 43, 1996, 181-191.
- STEGER, H.- GIRSCHEWSKI, H.- PIATKOWSKI, B.: Die Beurteilung des Ketosisstatus laktierender Rinder aus der Konzentration der Ketokörper im Blut und des Azetons in der Milch. *Arch. Tierernähr.*, 22, 1972, 157-162.
- TEDESCO, D.- TAVA, A.- GALLETTI, S.- TAMENI, M.- VARISCO, G.- COSTA, A.- STEIDLER, S.:

- Effects of silymarin a natural hepatoprotector, in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 87, 2004, 2239-2247.
- UNGLAUB, W.: Untersuchung zur Bestimmung und zum Gehalt des Azeton in Milch. *Tierärztl. Umsch.*, 1983, 534-543.
- VOJTÍŠEK, B.: The determination of acetone in milk, colostrum, blood and urine of dairy cows by microdiffusion method. (In Czech) *Veterinářství*, 36, 1986, 9, 394-396.
- VOJTÍŠEK, B.- HRONOVÁ, B.- HAMŘÍK, J.- JANKOVÁ, B.: Milk thistle (*Silybum marianum*) in feed rations administered to ketotic cows. (In Czech) *Veter. Med. (Praha)*, 36, 6, 1991, 321-330.
- WALDMANN, A.- REKSEN, O.- LANDSVERK, K.- KOMMISRUUD, E.- ROPSTAD, E.: Relationship between milk acetone at first insemination and reproductive performance and fertility of Norwegian cattle. *ESDAR, Dublin*, 5.-6. září, 2003.
- WOOD, G. M.- BOETTCHER, D. F.- KELTON, D. F.- JANSEN, G. B.: Phenotypic and genetic influences on test-day measures of acetone concentration in milk. *J. Dairy Sci.*, 87, 2004, 1108-1114.

VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

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

- HANUŠ, O.: Aktuální otázky praxe k výskytu inhibičních látek, „nežádoucích metabolitů“ a zdraví mléčné žlázy. A present-day questions to the occurrence of inhibitory substances, „unrequested metabolities“ and health condition of mammary gland from the practice. *Výzkum v chovu skotu*, XXXVI, 1994, 3, 25-41.
- HANUŠ, O.- BEBER, K.- FICNAR, J.- GENČUROVÁ, V.- GABRIEL, B.- BERANOVÁ, A.: Relationship between the fermentation of bulk milk sample, its composition and contents of some metabolites. (In Czech) *Živoč. Výr. / Czech J. Anim. Sci.*, 38, 7, 1993, 635-644.
- HANUŠ, O.- BJELKA, M.- TICHÁČEK, A.- JEDELSKÁ, R., KOPECKÝ, J.: Analýza nezbytnosti a účelnosti transformací dat u souborů výsledků některých mléčných parametrů. Substantiation and usefulness of transformations in data sets of analyzed milk parameters. In *Chov a šlechtění skotu pro konkurenceschopnou výrobu: sborník referátů VÚCHS Rapotín*, In Rearing and breeding of cattle for competitionable production: proceedings of the seminar VÚCHS Rapotín, 2001 a, 122-135.
- 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, ISSN 1801-7576, 563-571.
- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- ROUBAL, P.- VORLÍČEK, Z.- ŘÍHA, J.- POZDÍŠEK, J.- BJELKA, M.: Dairy cow breed impacts on some chemical-compositional, physical, health and technological milk parameters. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research XLV*, 4, 2003, 1-10.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- LANDOVÁ, H.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: The comparison of relationships between milk indicators in different species of ruminants in the Czech Republic. *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, L, 183, 3, 2008, ISSN 0139-7265, 35-44.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ZHANG, Y.- HERING, P.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- DOLÍNKOVÁ, A.- MOTYČKA, Z.: Milk acetone determination by the photometrical method after microdiffusion and via FT infra-red spectroscopy. Stanovení acetonu v mléce fotometricky po mikrodifúzi a pomocí infračervené spektroskopie FT. *Journal of Agrobiology*, 28, 1, ISSN 1803-4403, 2011 a, 33-48.
- HANUŠ, O.- HLÁSNÝ, J.- SKYVA J.- TRAJLINEK, J.: Ketózy, vážný problém vysoce dojných

- stád. *Náš chov*, 2002, 3, 27-29.
- HANUŠ, O.- HLÁSNÝ, J.- TRAJLÍNEK, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Výsledky vyšetření dojníc na subklinickou nebo klinickou ketózu (testování semikvantitativního diagnostika Ketotest – ketolátky v mléce). Results of dairy cows examination on subclinical or clinical ketosis (evaluation of semiquantitative diagnostic tool Ketotest – ketone bodies in milk. In *Nové trendy v organizačních, technologických a hygienických postupech nákupu syrového mléka v kontextu podmínek EU: sborník referátů OAK Šumperk*, In *New trends in organizational, technological and hygienical procedures of raw milk purchase in the context to EU conditions: proceedings of the seminar OAK Šumperk*, 2001 b, 88-90.
- HANUŠ, O.- KUČERA, J.- YONG, T.- CHLÁDEK, G.- HOLÁSEK, R.- TRINÁCTÝ, J.- GENČUROVÁ, V.- SOJKOVÁ, K.: Effect of sires on wide scale of milk indicators in first calving Czech Fleckvieh cows. Vliv otců na širokou škálu mléčných ukazatelů u prvotelek Českého strakatého plemene. *Archiv Tierzucht / Archives Animal Breeding*, 54, 1, ISSN 003-9438, 2011 b, 36-50.
- HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- SAMKOVÁ, E.- FALTA, D.- CHLÁDEK, G.- VYLETĚLOVÁ - KLIMEŠOVÁ, M.: Cross validation of cut-off limit estimations for milk indicators of subclinical ketosis. Křížová validace odhadů prahových hodnot pro mléčné ukazatele subklinické ketózy. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LXI, 6, ISSN 1211-8516, 2013 a, 1661-1667.
- HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- VYLETĚLOVÁ, M.- YONG, T.- BJELKA, M.- DUFEK, A.: The relations of some milk indicators of energy metabolism in cow, goat and sheep milk. Vztahy některých mléčných ukazatelů energetického metabolismu v kravském, kozím a ovčím mléce. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 42, 3, ISSN 1211-3174, 2011 c, 102-112.
- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.: Vztahy obsahů močoviny a acetonu v mléce k plodnosti a dlouhověkosti dojníc. Relationships of milk urea and acetone contents to fertility and longevity of dairy cows. *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, 2002, 2, 13-16.
- HANUŠ, O.- SKYVA, J.- FICNAR, J.- JÍLEK, M.- TICHÁČEK, A.- JEDELSKÁ, R.- DOLÍNKOVÁ, A.: Poznámky k interpretačním postupům hodnocení výsledků obsahů ketonů a acetonu (Ketotest) v individuálních vzorcích mléka. A notes to interpretation procedures of results ketone and acetone contents evaluation (Ketotest) in individual cow's milk samples. *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, 1999, 4, 17-34.
- HANUŠ, O.- TRAJLINEK, J.- HLÁSNÝ, J.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Problematika ketóz, jejich diagnostiky a monitoringu. Ketosis problem, its diagnostic and monitoring. In *Chov a šlechtění skotu pro konkurenceschopnou výrobu: sborník referátů VÚCHS Rapotín*, In *Rearing and breeding of cattle for competitionable production: proceedings of the seminar VÚCHS Rapotín*, 2001 c, 105-113.
- HANUŠ, O.- VYLETĚLOVÁ - KLIMEŠOVÁ, M.- CHLÁDEK, G.- ROUBAL, P.- SEYDLOVÁ, R.: Metaanalysis of ketosis milk indicators in terms of their threshold estimation. Metaanalýza mléčných ukazatelů ketózy ve smyslu odhadu jejich prahových hodnot. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LXI, 6, ISSN 1211-8516, 2013 b, 1681-1692.
- HANUŠ, O.- YONG, T.- KUČERA, J.- GENČUROVÁ, V.- DUFEK, A.- HANUŠOVÁ, K.- KOPEC, T.: The predicative value and correlations of two milk indicators in monitoring energy metabolism of two breeds of dairy cows. Predikční hodnota a korelace dvou mléčných ukazatelů v monitoringu energetického metabolismu dvou plemen dojníc. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 42, 1, ISSN 1211-3174, 2011 d, 1-11.
- 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.
- ŘÍHA, J.- HANUŠ, O.: The relationships between individual reproduction parameters and milk composition in first 120 lactation days. (In Czech) *Výzkum v chovu skotu / Cattle Research*, XLI, 4, 1999, 3-17.

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.

Ne všechny práce ze seznamu literatury (6, 7), 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.

Přílohy, dokumenty a doklady:

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

Datum: 15. 11. 2013

Za zhotovitele:
prof. Dr. Ing. Oto Hanuš

.....

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

Certifikovaná metodika pro praxi byla podporována řešením projektů NAZV KUS QJ1210301, RO0513 (z února 2013) a FA MENDELU TP 2/2013.

8) Přílohové materiály s podklady pro vývoj certifikované metodiky

Přílohy této certifikované uplatněné metodiky (Identifikace subklinické ketózy krav v časně laktaci podle výsledků doживosti a individuálních vzorků mléka v kontrole užítkovosti a interpretace výsledků) tvoří vlastní výsledky vývoje a metodického testování tzn., publikace, případně manuskripty budoucích publikací a grafické zpracování statistických dat.

Přílohy

HANUŠ, O.- VYLETĚLOVÁ - KLIMEŠOVÁ, M.- CHLÁDEK, G.- ROUBAL, P.- SEYDLOVÁ, R.: **Metaanalysis of ketosis milk indicators in terms of their threshold estimation.** Metaanalýza mléčných ukazatelů ketózy ve smyslu odhadu jejich prahových hodnot. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., LXI, 6, ISSN 1211-8516, 2013, 1681-1692.

HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- SAMKOVÁ, E.- FALTA, D.- CHLÁDEK, G.- VYLETĚLOVÁ - KLIMEŠOVÁ, M.: **Cross validation of cut-off limit estimations for milk indicators of subclinical ketosis.** Křížová validace odhadů prahových hodnot pro mléčné ukazatele subklinické ketózy. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., LXI, 6, ISSN 1211-8516, 2013, 1661-1667.

Statistické vyhodnocení vzájemných vztahů ketózních mléčných ukazatelů (aceton, tuk/hrubé bílkoviny, tuk/laktóza) na relevantních datových souborech individuálních vzorků mléka jako základ odvození prahových limitů k pravidelné identifikaci subklinické ketózy v kontrole užítkovosti dojníc.