

Rozšíření spektra při centrální kalibraci a výkonnostním testování analytické způsobilosti prostřednictvím Národní referenční laboratoře pro syrové mléko Rapotín

Spectrum enlargement at central calibration and proficiency testing by National reference laboratory for raw milk in Rapotín

Hanuš, O.¹ – Genčurová, V.² – Landová, H.² – Jedelská, R.¹ – Kopecký, J.¹ – Dolínková, A.¹

¹ Výzkumný ústav pro chov skotu Rapotín, s.r.o.

² Agrovýzkum Rapotín s.r.o.

ABSTRACT

Methods of central calibration of indirect methods and proficiency testing of reference and indirect methods play momentarily more important role in routine monitoring of quality it means composition and properties of raw and pasteurized milk. The analyse results serve for animal genetical improvement, monitoring their health, milk quality payment and control of technological procedures and safety of milk food chain. Goal was to describe newly established proficiency testing (PT) by National reference laboratory for raw milk (NRL-RM) in Rapotín in the Czech dairy system. After client order the PTs about indirect determination of casein (CAS) and solids non fat (SNF) were newly established on the principle of Euclidian distance from origin. These PTs of infrared mid spectroscopy (MIR) and MIR with Fourier's transformations (MIR-FT) are performed quarterly. Mentioned PTs connect on monthly organized PT of MIR and MIR-FT analyses of fat (F), proteins (P) and lactose (L) and quarterly PT of milk freezing point depression (FPD) and FPD equivalent (reference cryoscopy and MIR and MIR-FT) and milk urea concentration (MUC; various reference methods including MIR-FT). The PTs of free fatty acids (FFAs) and citric acid (CA) by MIR-FT are tentatively evaluated simultaneously. Till February 2011 the NRL-RM carried out 103 PTs for F, P and L, 40 PTs for MUC, 27 FFAs, 26 FPD, 23 CA, 8 SNF and 3 CAS. Unsuccessfulness in PTs was: 27.8% for CAS; 20.4 SNF; 30.2 FFAs; 31.8% CA. Statistical characteristics (mean \bar{x} and standard deviation s_x) for d (mean difference from reference values) and sd (d standard deviation) values of PT participant sets (all (I) and successful (II)) showed lower values of II set as logical. I and II sets offer values for calculation of some methodical limits of PT ($\times 1.96 = 95\%$ level of confidence interval). Such calculations are important for following validation and accreditation of PT procedures. The results are usable in the practice of reference and routine milk laboratories at increase of quality assurance of analytical values.

Key words:

milk, infrared spectroscopy, casein, solids non fat, citric acid, free fatty acids, freezing point depression, urea, fat, protein, lactose, proficiency testing, Euclidian distance from origin

ABSTRAKT

Metody centrální kalibrace nepřímých metod a výkonnostního testování referenčních i nepřímých metod hrají stále významnější roli v rutinním sledování kvality, tzn. složení a vlastností syrového i pasterovaného mléka. Výsledky analýz slouží pro šlechtění zvířat, monitoring jejich zdraví, proplácení kvality mléka a kontrolu technologických postupů a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce. Cílem bylo popsat nově etablované výkonnostní testy (PT) v českém mlékařském systému v Národní referenční laboratoři pro syrové mléko (NRL-SM) Rapotín. Podle klientské zakázky byly na principu určení Euklidické vzdálenosti od počátku zavedeny nově PT nepřímého stanovení kaseinu (KAS) a sušiny tukuprosté (STP). Tyto PT infračervené spektroskopie (MIR) a MIR s Fourierovými transformacemi (MIR-FT) se

uskutečňují kvartálně. Navazují na měsíčně organizované PT analýz MIR a MIR-FT tuku (T), bílkovin (B) a laktózy (L) a kvartální PT bodu mrznutí mléka (BMM) a ekvivalentu BMM (referenční kryoskopie a MIR a MIR-FT) a koncentrace močoviny (KMM; různé referenční metody včetně MIR-FT). Zároveň jsou vývojově vyhodnocovány PT volných mastných kyselin (VMK) a kyseliny citrónové (KC) pomocí MIR-FT. Do února 2011 provedla NRL-SM 103 PT pro T, B a L, 40 PT pro KMM, 27 VMK, 26 BMM, 23 KC, 8 STP a 3 KAS. Neúspěšnost v PT byla: 27,8 % pro KAS; 20,4 STP; 30,2 VMK; 31,8 KC. Statistické charakteristiky (průměr \bar{x} a směrodatná odchylka s_x) hodnot d (průměrná diference od referenčních hodnot) a s_d (směrodatná odchylka d) souborů účastníků PT (všech (I) a úspěšných (II)) ukázaly logicky nižší hodnoty souboru II. Soubory I a II poskytují podklady pro výpočty některých metodických limitů PT ($\times 1,96 = 95\%$ interval spolehlivosti). Takové výpočty jsou významné při následující validaci a akreditaci postupů PT. Výsledky jsou použitelné v praxi referenčních a rutinních mléčných laboratoří při zvyšování zajištění kvality analytických hodnot.

Klíčová slova:

mléko, infračervená spektroskopie, kasein, sušina tukuprostá, kyselina citrónová, volné mastné kyseliny, deprese bodu mrznutí, močovina, tuk, bílkoviny, laktóza, výkonnostní test analytické způsobilosti, Euklidická vzdálenost od počátku

ÚVOD

Centrální kalibrace a výkonnostní testy v pracovní síti mléčných laboratoří

Principy a přednosti síťového uspořádání referenčních a rutinních mléčných laboratoří přispívají k aplikaci systému centrální kalibrace (Barbano, 2009; Castaneda, 2009; Hanuš *et al.*, 2010 a) pro nepřímé měření složek a vlastností mléka a následně rovněž výkonnostního testování analytické způsobilosti. Postupy jejich vyhodnocování byly rozpracovány v řadě publikací (Michalak, 1972; Sherbon, 1975; Michalak *et al.*, 1978; Vines *et al.*, 1986; Leray, 1993, 2006, 2009 a, b, c, 2010; Wood, 1994; Golc-Teger *et al.*, 1996; Golc-Teger, 1996, 1997; Hanuš *et al.*, 1998, 2006; Aebi a Bühlmann, 2000 a, b; Fuchs, 2000; Coveney, 2001; Tomáška *et al.*, 2006). V laboratorních sítích je dobře možná účinnější kontrola věrohodnosti výsledků referenčními mléčnými nebo jinými standardy (definovanými vzorky) ale zejména metodami výkonnostního testování (kruhové nebo hvězdicové testy). Postup práce zahrnuje specifikaci různých hladin pracovních sítí a jejich hierarchii (Grappin, 1993), metody centrální kalibrace (Baumgartner, 2007, 2009) a design statistického vyhodnocování výsledků kalibrací a PT, jako metody určení referenčních hodnot, posouzení variability odchylek atp. (Grappin, 1987; Arndt *et al.*, 1991; Leray, 1993, 2006; Heeschen *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 1998; Coveney, 2001; Říha *et al.*, 2008). Proces tvorby pracovních sítí se stal součástí AQA (analytical quality assurance) mléčných laboratoří a také jejich akreditačních řízení a auditů.

Výsledkové neshody a možnosti jejich eliminace

Výsledkové neshody v akreditovaných laboratořích jsou obvykle určeny neúspěšnou účastí ve výkonnostním testu analytické způsobilosti. Dalším případem je nepřekrytí oborů rozšířených kombinovaných nejistot při porovnání výsledků mezi laboratořemi na identických vzorcích, v tomto případě mléka. Zvýšená frekvence výskytu výsledkových neshod může být vážným problémem analytického života laboratoře. Je proto třeba pracovat na postupech její eliminace. Výsledkové neshody lze podle původu dělit na dva zdroje. Je to chyba systematická a náhodná. Statistické zpracování výsledků analýz v PT monitoruje momentální a průběžnou věrohodnost výsledků. Design hodnocení PT často směřuje k nějaké možnosti diagnózy o který typ chyby se v případě konkrétní laboratoře jedná (Fuchs, 2000; Hanuš *et al.*, 1998, 2006 a). Postupy zahrnují především různá standardizovaná resp. relativizovaná číselná výsledková vyjádření a k nim korespondující grafická zobrazení: testy odlehlosti (nejčastěji Grubbsův); Z-score; Euklidická

distance; Youden plot; regulační Shewhartovy diagramy; popřípadě jejich kombinace (Grappin, 1987; Leray, 1993; Wood, 1994; Fuchs, 2000; Aebi a Bühlmann, 2000 a, b; Coveney, 2001; Hanuš *et al.*, 2006 a, b).

Cíl práce

Cílem bylo popsat nově etablované centrální kalibrace a výkonnostní testy (PT) v českém mlékařském systému v Národní referenční laboratoři pro syrové mléko Rapotín (NRL-SM).

MATERIÁL A METODY

V NRL-SM v Rapotíně (č. 1340, akreditační certifikát 040/2005) byly zavedeny nově centrální kalibrace (Hanuš *et al.*, 2010 a) podle vlastních výsledků relevantních referenčních metod (vázaných na ICAR-CECALAIT PT) a dále PT nepřímého stanovení kaseinu (KAS) a sušiny tukuprosté (STP). Jsou to PT infračervené spektroskopie (MIR) a MIR s Fourierovými transformacemi (MIR-FT; Hanuš *et al.*, 2008 a, b, 2009 a, b, c, 2010 a, 2011 a; Hering *et al.*, 2008; Genčurová *et al.*, 2009 a 2011). Byly také pokusně vyhodnocovány PT stanovení volných mastných kyselin (VMK; Hanuš *et al.*, 2008 a; 2009 c; Genčurová *et al.*, 2009, 2011) a kyseliny citrónové (KC; Hanuš *et al.*, 2009 b) pomocí MIR-FT. Tyto PT historicky navázaly na již dříve zpracované potupy v NRL-SM a byly průběžně ověřovány.

Jako metoda MIR byly použity přístroje Bentley 2000 a 150 (Bentley Instruments, USA) a MilkoScan 133 B (Foss Electric, Dánsko). Jako technologie MIR-FT byly použity přístroje Lactoscope FTIR (Delta Instruments, Holandsko) a MilkoScan FT 6000 (Foss Electric, Dánsko). Přístroje v šesti akreditovaných laboratořích byly provozovány podle relevantních standardních operačních postupů a v souladu s ČSN 57 0536.

Principem vyhodnocení PT byla derivace referenčních hodnot a výpočet a grafické zobrazení Euklidické vzdálenosti od počátku na bázi postupů popsaných již dříve ve více publikacích (Leray, 1993, 2006, 2009 a, b, c, 2010; Hanuš *et al.*, 1998, 2006 a, b).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Podle klientské zakázky byly na principu určení Euklidické vzdálenosti od počátku zavedeny nově PT nepřímého stanovení kaseinu (KAS) a sušiny tukuprosté (STP) včetně postupu jejich centrální kalibrace. Tyto PT infračervené spektroskopie (MIR) a MIR s Fourierovými transformacemi (MIR-FT) se uskutečňují kvartálně. Navazují na měsíčně organizované PT analýz MIR a MIR-FT tuku (T), bílkovin (B) a laktózy (L) a kvartální PT bodu mrznutí mléka (BMM; Crombrugge, 2003) a ekvivalentu (Tomáška *et al.*, 2005) BMM (referenční kryoskopie a MIR a MIR-FT) a koncentrace močoviny (KMM; různé referenční metody včetně MIR-FT; Hanuš *et al.*, 2008 b, 2009 a; Hering *et al.*, 2008). Zároveň byly vývojově vyhodnocovány PT volných mastných kyselin (VMK) a kyseliny citrónové (KC) pomocí MIR-FT.

Do současnosti (únor 2011) NRL-SM provedla v laboratorní pracovní síti (Česká a Slovenská republika) 103 PT pro T, B a L (současně), 40 PT pro KMM, 27 pro VMK, 26 pro BMM, 23 pro KC, 8 pro STP a 3 pro KAS. Základní výsledková struktura vybraných PT je shrnuta v Tab. 1. Je možné všimnout si průměrného % neúspěšnosti v PT: 27,8 pro KAS; 20,4 pro STP; 30,2 pro VMK; 31,8 pro KC. Tato hodnota je ovlivňována charakterem rozptylu hodnot výsledků v PT. Při vyšším počtu účastníků a přiblížení se charakteru normální frekvenční distribuce (modelu Gaussovy křivky) odchylek výsledků od referenčních hodnot jsou typické hodnoty nastavení PT pro % neúspěšnosti podobné těm u KAS a STP.

V Tab. 2, 3, 4 a 5 a korespondujícím způsobem na Obr. 1, 2, 3 a 4 jsou uvedeny vybrané příklady výsledků PT (NRL-SM) pro KAS, STP, VMK a KC, které demonstrují variabilitu analytických výsledků, jejich diagnostické trendy k systematickým a náhodným chybám (souřadnice d a sd v grafech) a tím dosahovanou věrohodnost výsledků měření v praxi rutinních laboratoří. PT pro VMK a KC jsou charakteristické nižším počtem účastníků a mají vývojově-

ověřovací charakter, zatímco u PT pro KAS a STP (Tab. 2 a 3 a Obr. 1 a 2) lze hovořit o plnohodnotnosti v praxi rutinních mléčných laboratořích a regulérnosti jako podkladů pro akreditační audity.

Výsledky uvedené jako statistické charakteristiky (průměr \bar{x} a směrodatná odchylka s_x) hodnot d a sd (vedle Euklidické vzdálenosti hlavních charakteristik PT) souborů všech účastníků (I; Tab. 6) z PT a jen úspěšných účastníků (II; Tab. 7) ukazují srovnání jejich variability. Toto srovnání z obou pohledů, jak s_x pro d tak x pro sd , naznačuje logicky nižší hodnoty pro soubor II u všech testovaných ukazatelů (KAS, STP, VMK a KC). Oba soubory pak poskytují podklady z dlouhodobé řady (vyjma KAS) pro případné výpočty některých metodických limitů v příslušném PT. Uveďme např. 1,96 násobky s_x pro 95% interval spolehlivosti a model normální frekvenční distribuce pro některou z charakteristik PT (d , sd). Takové výpočty jsou pak významné při validaci a akreditaci uvedených postupů PT.

Dále pokud se například jedná o metody stanovení počtu somatických buněk (PSB) v mléce, jako ukazatele zdravotního stavu krav, jsou tyto často předmětem PT s vyhodnocením na různých principech (Vines *et al.*, 1986; Arndt *et al.*, 1991; Heeschen *et al.*, 1994; Aebi a Bühlmann, 2000 a, b; Říha *et al.*, 2008; Hanuš *et al.*, 2011 b). V současnosti je řešen projekt (mezinárodní autority v mlékařství jako jsou IDF, ICAR a ANSES) s cílem vytvoření mezinárodního referenčního systému, protože právě tyto analýzy trpí častějším výskytem výsledkových neshod a kalibrace postrádají silnější lokální podmíněnost, jako je tomu u analýz MIR a MIR-FT pro složení mléka. Somatická buňka jako entita není tak vázána na lokalitu a například typ nebo sezónu výživy dojníc, jako třeba tuková molekula nebo celá mléčná matrice (pozadí) pro analýzy MIR a MIR-FT.

Vývojové kroky a výsledky z více prací NRL-SM o kalibraci nepřímých metod v mlékařství a jejich výkonnostním testování byly syntetizovány v metodické Tab. 8, která shrnuje některé základní principy a postupy přípravy referenčních a kontrolních vzorků ke kalibraci a PT.

ZÁVĚR

Výsledky vývoje, popisu a implementace nových PT (KAS, STP, VMK a KC nepřímých metod MIR a MIR-FT) do laboratorní sítě v České republice jsou použitelné v praxi referenčních a rutinních mléčných laboratořích při zvyšování zajištění kvality analytických hodnot.

Práce byla podporována projekty MŠMT LA 09030 a MSM 2678846201, aktivitami NRL-SM a vzdělávacího projektu MŠMT CZ.1.07/2.3.00/09.0081.

Literární reference

- AEBI, R. – BÜHLMANN, G. (2000 a): Der FAM-Zellzahl-Standard. *AFEMA Tagung*, Mosonmagyaróvár, 2000.
- AEBI, R. – BÜHLMANN, G. (2000 b): Qualitätssicherung der Zellzahlbestimmung. *AFEMA Tagung*, Mosonmagyaróvár, 2000.
- ARNDT, G. – WEISS, H. – UBBEN, E. H. (1991): Der Gehalt somatischer Zellen in der Rohmilch: Beiträge zu Messung, Interpretation und praktischer Bedeutung für Milchqualität und Mastitisbekämpfung. I. Statistische Verfahren zur Beurteilung der Datenqualität von Ringversuchsergebnissen, dargestellt am Beispiel der Zählung somatischer Zellen in Milch. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber.*, 1991, 43, s. 167–178. ISSN 0023-1347
- BARBANO, D. (2009): Reference system and centralized calibration for milk (payment) testing. In: *Proc. of 36th ICAR biennial session*, Niagara Falls, USA, June 2008, *ICAR Technical series no. 13*, 2009, s. 315–316. ISBN 92-95014-09-X, ISSN 1563-2504

- BAUMGARTNER, C. (2007): Reference system – Principle and practice. In: *Proceedings of the 35th biennial session of ICAR, EAAP publication No. 121, Breeding, production recording, health and the evaluation of farm animals*, Kuopio, Finland, June 2006, 2007, s. 309. ISBN 978-90-8686-030-2, ISSN 0071-2477
- BAUMGARTNER, C. (2009): The way to reference systems and centralised calibration for milk recording testing. Present status in Germany. In: *Proc. of 36th ICAR biennial session*, Niagara Falls, USA, June 2008, *ICAR Technical series no. 13*, 2009, s. 307. ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X
- CASTANEDA, R. (2009): Reference system and centralized calibration for milk recording testing in Argentina. In: *Proc. of 36th ICAR biennial session*, Niagara Falls, USA, June 2008, *ICAR Technical series no. 13*, 2009, s. 309–313. ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X
- COVENEY, L. (2001): Milk testing proficiency scheme, Round 26 – November 2001. *Example laboratory*, Savant Technologies, 2001, 12.
- CROMBRUGGE VAN, J. M. (2003): Freezing Point. *Bulletin of IDF*, 2003, 383, s. 15–22. ISSN 0250-5118
- ČSN 57 0530: *Methods for testing of milk and milk products* (In Czech). Vydavatelství úřadu pro normalizaci a měření, 1973, Praha.
- ČSN 57 0536: *Determination of milk composition by mid-infrared analyzer*. (In Czech) Český normalizační institut, 1999, Praha.
- FUCHS, M. (2000): Der AFEMA-Sterntest: ein Beitrag zur internationalen Harmonisierung der Rohmilchanalytik. *XXVIII ÓVÁRI TUDOMÁNYOS NAPOK*, Mosonmagyaróvár, 2000, s. 71–75.
- GENČUROVÁ, V. – HANUŠ, O. – JEDELSKÁ, R. – KOPECKÝ, J. (2011): Tvorba a vývoj kalibračního modelu pro nepřímé stanovení volných mastných kyselin mléčného tuku a metody přípravy referenčních vzorků. *Výzkum v chovu skotu*, 2011, LIII, 193, 1, 2011, přijato. ISSN 0139-7265
- GENČUROVÁ, V. – HANUŠ, O. – KUČERA, J. – SOJKOVÁ, K. – KOPECKÝ, J. – JEDELSKÁ, R. (2009): Free fatty acids as possible indicator for milk quality improvement. *Acta fytotech. zootech.*, 2009, 12, (M. č.), s. 25–28. ISSN 1335-258X
- GOLC-TEGER, S. (1997): Slovenia in the European network of dairy laboratories. In: 5th International Symposium „Animal Science Days“, Opatija, 23.–26. September 1997. *Animal science days, Agriculturae Conspectus Scientificus*, 62, 1997, s. 37–40. ISSN 1331-7768
- GOLC-TEGER, S. (1996): Zagotavljanje kakovosti analiz v mlekarških laboratorijih = Analytical quality assurance in dairy laboratories. In: 1. slovenski mednarodni kongres Mleko in mlečni izdelki, Portorož, Slovenija, 20.–22. September 1995. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani*, 1996, s. 279–283.
- GOLC-TEGER, S. – POGAČAR, J. – VALINGER, E. (1996): The Slovenian dairy laboratories proficiency testing scheme. In: *Analytical quality and economic efficiency in dairy food laboratories: abstracts*. Sonthofen, International Dairy Federation (IDF), AOAC International, German Dairy Association, 1996, s. 3.
- GRAPPIN, R. (1993): European network of dairy laboratories. In: *Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories*. Sonthofen /Germany, 1992–05–18/20, Brussels, 1993, s. 205–211.
- GRAPPIN, R. (1987): 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, s. 3–12.
- HANUŠ, O. – BENDA, P. – JEDELSKÁ, R. – KOPECKÝ, J. (1998): Design and evaluation of the first national qualitative testing of routine milk analyses. (In Czech) *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. (Brno)*, XLVI, 3, 1998, 33–53.
- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – JANŮ, L. – MACEK, A. – HERING, P. – KLIMEŠ, M. – ZAJÍČKOVÁ, I. (2006 a): Zajištění kvality výsledků analýz složení mléka modifikacemi testů laboratorní způsobilosti. *Výzkum v chovu skotu*, 2006, XLVIII, 173, 1, s. 1–19. ISSN 0139-7265
- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – JEDELSKÁ, R. – ŠTOLC, L. – KLÍMOVÁ, Z. – MOTYČKA, Z. – KOPECKÝ, J. (2009 a): Validace a nejistoty měření koncentrace močoviny a bodu mrznutí mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR-FT) pro laboratoře kvality mléka. *Výzkum v chovu skotu*, 2009, LI, 186, 2, s. 40–53. ISSN 0139-7265
- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – KOPECKÝ, J. – JEDELSKÁ, R. – MOTYČKA, Z. – ČERNOCKÝ, M. (2008 a): Interpretace výsledků experimentální kalibrace rutinních IR přístrojů pro měření látkového obsahu

- volných mastných kyselin (VMK) mléčného tuku. *Výzkum v chovu skotu*, 2008, L, 182, 2, s. 55–62. ISSN 0139-7265
- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – ZHANG, Y. – HERING, P. – KOPECKÝ, J. – JEDELSKÁ, R. – DOLÍNKOVÁ, A. – MOTYČKA, Z. (2011 a): Milk acetone determination by photometrical method after microdiffusion and via FT infra-red spectroscopy. *J. Agrobiol.*, 2011, accepted. ISSN 1803-4403
- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – KOPEC, T. – YONG, T. – JANŮ, L. (2010 b): Validation of modified milk reference sample in terms of its suitability for infra-red analysis calibration via evaluation of physical properties. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 2010, LVIII, 2, s. 101–110. ISSN 1211-8516
- HANUŠ, O. – HERING, P. – FRELICH, J. – JÍLEK, M. – GENČUROVÁ, V. – JEDELSKÁ, R. (2008 b): Reliability of results of milk urea analysis by various methods using artificial milk control samples. *Czech J. Anim. Sci.*, 2008, 53, 4, s. 152–161. ISSN 1212-1819
- HANUŠ, O. – HULOVÁ, I. – GENČUROVÁ, V. – ŠTOLC, L. – KUČERA, J. – KOPECKÝ, J. – JEDELSKÁ, R. – MOTYČKA, Z. (2009 b): Interpretace výsledků pokusné kalibrace pro stanovení kyseliny citronové v mléce infračervenou spektroskopí (MIR-FT). *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 2009, LVII, 5, s. 87–101. ISSN 1211-8516
- HANUŠ, O. – JANŮ, L. – KLIMEŠ, M. – HERING, P. – ZAJÍČKOVÁ, I. – GENČUROVÁ, V. – MACEK, A. (2006 b): Postupy odhadů a použití diskriminačních limitů pro hodnocení správnosti výsledků při testování mlékařských laboratoří. *Výzkum v chovu skotu*, 2006, XLVIII, 174, 2, s. 1–17. ISSN 0139-7265
- HANUŠ, O. – KUČERA, J. – GENČUROVÁ, V. – KOPECKÝ, J. – JEDELSKÁ, R. (2009 c): Vybrané parametry validace metody MIR-FT k měření volných mastných kyselin v mléčném tuku pro laboratoře kvality mléka. *Výzkum v chovu skotu*, 2009, LI, 187, 3, s. 27–34. ISSN 0139-7265
- HANUŠ, O. – SOJKOVÁ, K. – HANUŠOVÁ, K. – SAMKOVÁ, E. – HRONEK, M. – HYŠPLER, R. – KOPECKÝ, J. – JEDELSKÁ, R. (2011 b): An experimental comparison of methods for somatic cell count determination in milk of various species of mammals. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 2011, LIX, 1, s. 67–82. ISSN 1211-8516
- HANUŠ, O. – VEGRICHT, J. – FRELICH, J. – MACEK, A. – BJELKA, M. – LOUDA, F. – JANŮ, L. (2008 c): Analyse of raw cow milk quality according to free fatty acids contents in the Czech Republic. *Czech J. Anim. Sci.*, 2008, 53, 1, s. 17–30. ISSN 1212-1819
- HANUŠ, O. – VYLETĚLOVÁ, M. – TOMÁŠKA, M. – SAMKOVÁ, E. – GENČUROVÁ, V. – JEDELSKÁ, R. – KOPECKÝ, J. (2011 c): The effects of sample fat value manipulation on raw cow milk composition and indicators. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 2011, LIX, 1, s. 101–112. ISSN 1211-8516
- HANUŠ, O. – YONG, T. – KUČERA, J. – GENČUROVÁ, V. – DUFEK, A. – HANUŠOVÁ, K. – KOPEC, T. (2011 d): The predicative value and correlations of two milk indicators in monitoring energy metabolism of two breeds of dairy cows. *Sci. Agric. Boh.*, 2011, přijato. ISSN 1211-3174
- HANUŠ, O. – YONG, T. – KUČERA, J. – GENČUROVÁ, V. – HANUŠOVÁ, K. – KOPEC, T. – KOPECKÝ, J. – JEDELSKÁ, R. (2010 a): Analýza výsledků kalibrací pro stanovení kaseinu nepřímou metodou infračervené spektroskopie. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 2010, LVIII, 5, s. 123–136. ISSN 1211-8516
- HERING, P. – HANUŠ, O. – FRELICH, J. – PYTLOUN, J. – MACEK, A. – JANŮ, L. – KOPECKÝ, J. (2008): Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 2008, 53, 2, s. 64–76. ISSN 1212-1819
- HEESCHEN, W. H. – UBBEN, E. H. – RATHJEN, G. (1994): Somatic cell counting in milk: the use of the principle of flow cytometry for somatic cell counting (Somacount) and comparison with the results obtained with the fluorescent optical principle (Fossomatic 360). *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber.*, May 1994. ISSN 0023-1347
- LERAY, O. (1993): CECALAIT: an organization to support analytical quality assurance in dairy laboratories. In: *Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories*. Sonthofen/Germany, 1992–05–18/20, Brussels, 1993, s. 349–360.
- LERAY, O. (2006): Reference and calibration system for routine milk testing – advantages / disadvantages, choice criteria. 3rd ICAR reference laboratory network meeting – Kuopio, Finland – 6th June, s. 49–65. *Breeding, production recording, health and the evaluation of farm animals. EAAP publication No. 121*, 2007, *Proceedings of the 35th biennial session of ICAR*, 2006, s. 311–317. ISBN 978-90-8686-030-2
- LERAY, O. (2009 a): 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, June 2008, *ICAR Technical series no. 13*, 2009, s. 291–294. ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X

- LERAY, O. (2009 b): ICAR AQA strategy – International anchorage and harmonisation. In: *Proc. of 36th ICAR biennial session*, Niagara Falls, USA, June 2008, *ICAR Technical series no. 13*, 2009, s. 295–300. ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X
- LERAY, O. (2009 c): Interlaboratory reference system and centralised calibration – Prerequisites and standard procedures. In: *Proc. of 36th ICAR biennial session*, Niagara Falls, USA, June 2008, *ICAR Technical series no. 13*, 2009, s. 301–305. ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X
- LERAY, O. (2010): Analytical precision performance in ICAR proficiency testing programmes. In: *Proc. of ICAR 37th Annual Meeting*, Riga, Latvia, 31 May– 4 June, *ICAR Technical Series No. 14*, 2010, s. 263–270. ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-10-3
- MICHALAK, W. (1972): Porównanie oznaczeń zawartości białka w mleku wykonywanych przez Laboratoria Wojewodzkich Stacji Oceny Zwierząt. *Biul. Inst. Gen. Hodow. Zwierząt PAN*, 1972, 27.
- MICHALAK, W. – CYNALIEWSKA, H. – OCZKOWICZ, H. (1978): Collaborative testing among laboratories routinely testing fat and protein milk. *J. Dairy Sci.*, 1978, 61, s. 1634–1636. ISSN 0022-0302
- ŘÍHA, J. – HANUŠ, O. – LEDVINA, D. – GENČUROVÁ, V. – SOJKOVÁ, K. – JEDELSKÁ, R. – KOPECKÝ, J. (2008): Autorizovaný software AS 1 – MSM 2678846201, SomaRing, www.vuchs.cz/software/somaring; informace ve *Výzkum v chovu skotu*, 2008, L, 183, 3, s. 67. ISSN 0139-7265
- SHERBON, J. W. (1975): Collaborative study of the Pro-Milk method for the determination of protein in milk. *J. AOAC*, 1975, 58, 4, s. 770–772. ISSN 1060-3271
- TOMÁŠKA, M. – HOFERICOVÁ, M – KOLOŠTA, M. (2005): The measurement of equivalent of milk freezing point. (In Slovak) *Mliekarstvo*, 2005, 36, 4, s. 7–9. ISSN 1210-3144
- TOMÁŠKA, M. – SUHREN, G. – HANUŠ, O. – WALTE, H. G. – SLOTTOVÁ, A. – HOFERICOVÁ, M. (2006): The application of flow cytometry in determining the bacteriological quality in raw sheep's milk in Slovakia. *Lait*, 2006, 86, s. 127–140. ISSN 0023-7302
- VINES, D. T. – JENNY, B. F. – WRIGHT, R. E. – GRIMES, L. W. (1986): Variation in milk fat, protein and somatic cell count from four dairy herd improvement laboratories. *J. Dairy Sci.*, 1986, 69, s. 2219–2223. ISSN 0022-0302
- WOOD, R. (1994): Proficiency testing and accreditation of food analysis Laboratories. In: *1. Conference on practical application of European legislation on foodstuffs*. Bled, Slovenia 1994–10–5/17, Ljubljana, 1994, s. 55–65.
- WOOD, R. – NILSSON, A. – WALLIN, H. (1998): 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, 312 s., ISBN 978-0-85404-566-2. s. 172–202.

Tab. 1 Dosavadní charakteristiky výkonnostních testů (PT) z NRL-SM

Ukazatel	KAS	STP	VMK	KC
Počet PT	3	8	27	23
Počet účastníků celkem (opakovaně)	18	54	97	67
Průměrný počet účastníků v PT	6,00±1,00	6,75±0,46	3,59±0,57	2,91±0,29
Počet neúspěšných účastníků	5	11	29	21
Průměrný počet neúspěšných účastníků	1,67±1,15	1,38±1,19	1,07±0,47	0,91±0,29
% neúspěšných účastníků	27,8	20,4	29,9	31,3

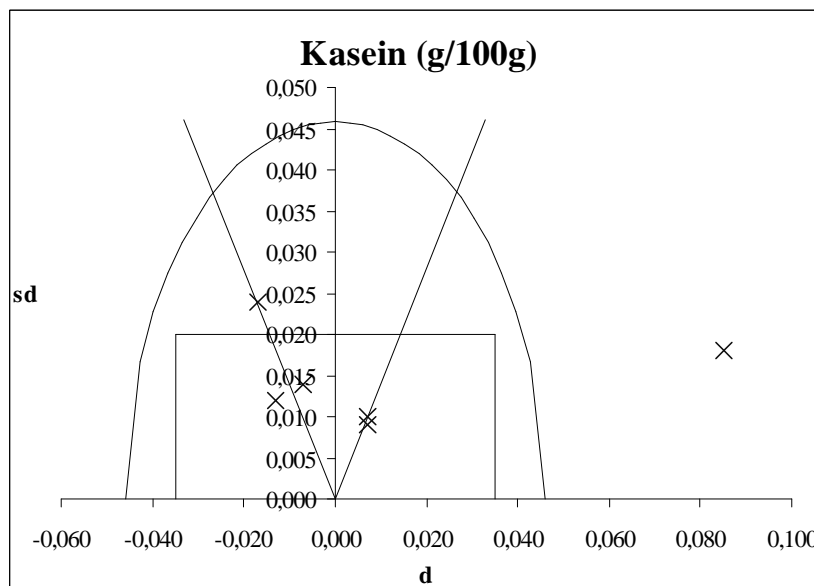
Tab. 2 Výsledky výkonnostního testu (PT) analytické způsobilosti stanovení kaseinu (KAS; diference v g/100g) v mléce metodami MIR a MIR-FT z NRL-SM

u	d	sd	RE	t	význ.
2-6	0,007	0,009	0,0114	2,46	*
2-5	0,007	0,010	0,0122	2,21	ns
2-4	-0,007	0,014	0,0157	1,58	ns
2-2	-0,013	0,012	0,0177	3,43	**
2-3	-0,017	0,024	0,0294	2,24	ns
2-1	0,085	0,018	0,0869	14,93	***
D	0,0227	0,0145			
sD	0,0346	0,0052			

→
diskriminační limit úspěšnosti účastníků (90 %)

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

Obr. 1 Graf Euklidické vzdálenosti výkonnostního testu (PT) analytické způsobilosti stanovení kaseinu (KAS) v mléce metodami MIR a MIR-FT z NRL-SM (Tab. 2)



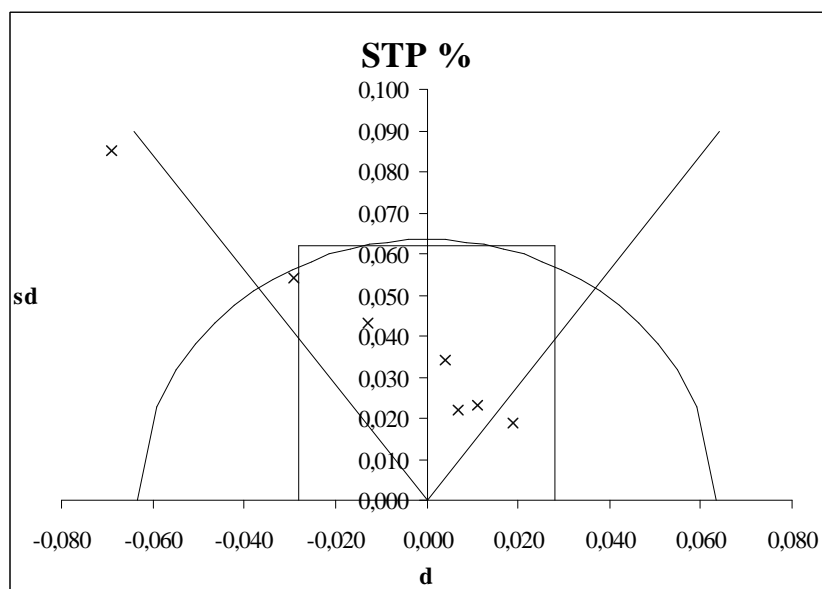
d = průměrná odchylka; sd = variabilita průměrné difference. Linie vycházející z centra grafu představují významnost odchylek, kdy body pod liniemi jsou významně odchýlené ($P \leq 0,05$), nad liniemi nevýznamně ($P > 0,05$). Půlkruh vymezuje úspěšný výsledek (hladina spolehlivosti 90 % pro RE), obdélník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

Tab. 3 Výsledky výkonnostního testu (PT) analytické způsobilosti stanovení sušiny tukuprosté (STP; diference v g/100g) v mléce metodami MIR a MIR-FT z NRL-SM

u	d	sd	RE	t	význ.
7-5	0,007	0,022	0,0231	1,01	ns
7-2	0,011	0,023	0,0255	1,51	ns
7-6	0,019	0,019	0,0269	3,16	*
7-1	0,004	0,034	0,0342	0,37	ns
7-7	-0,013	0,043	0,0449	0,96	ns
7-3	-0,029	0,054	0,0613	1,70	ns
7-4	-0,069	0,085	0,1095	2,57	*
D	0,0217	0,0400			
sD	0,0283	0,0218			

→ diskriminační limit úspěšnosti účastníků (90 %)

Obr. 2 Graf Euklidické vzdálenosti výkonnostního testu (PT) analytické způsobilosti stanovení sušiny tukuprosté (STP) v mléce metodami MIR a MIR-FT z NRL-SM (Tab. 3)



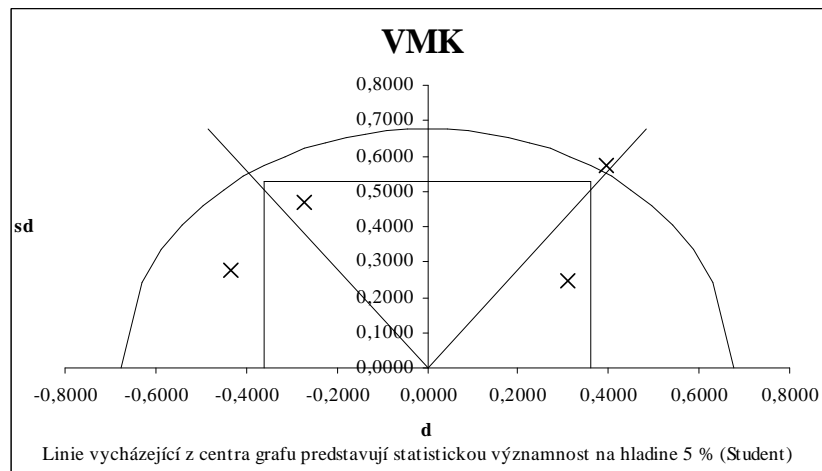
d = průměrná odchylka; sd = variabilita průměrné diference. Linie vycházející z centra grafu představují významnost odchylek, kdy body pod liniemi jsou významně odchýlené ($P \leq 0,05$), nad liniemi nevýznamně ($P > 0,05$). Půlkruh vymezuje úspěšný výsledek (hladina spolehlivosti 90 % pro RE), obdélník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

Tab. 4 Výsledky výkonnostního testu (PT) analytické způsobilosti stanovení volných mastných kyselin (VMK; diference v mmol/100g) v mléčném tuku metodami MIR a MIR-FT z NRL-SM

u	d	sd	RE	t	význ.
2-PM-T	0,310	0,245	0,395	4,006	**
1-PM-T	-0,433	0,275	0,513	4,980	***
4-PM-T	-0,273	0,468	0,542	1,844	ns
3-PM-T	0,396	0,573	0,696	2,184	ns
D	0,353	0,390			
sD	0,3589	0,1358			

→ diskriminační limit úspěšnosti účastníků (90 %)

Obr. 3 Graf Euklidické vzdálenosti výkonostního testu (PT) analytické způsobilosti stanovení volných mastných kyselin (VMK) v mléčném tuku metodami MIR a MIR-FT z NRL-SM (Tab. 4)



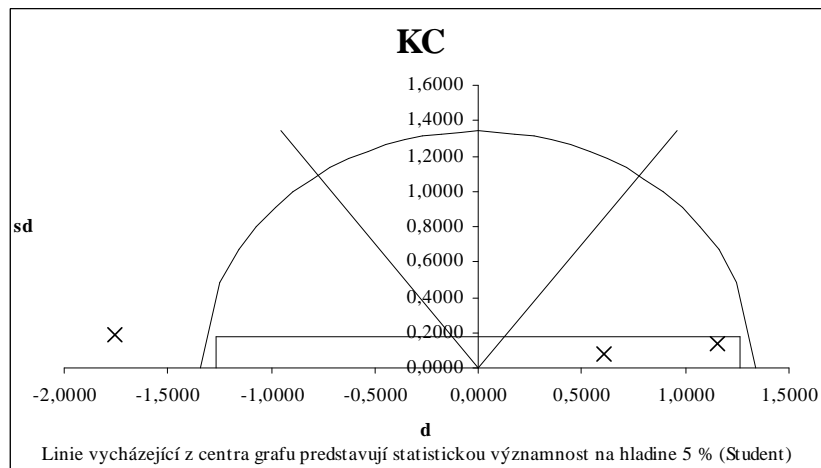
d = průměrná odchylka; sd = variabilita průměrné difference. Linie vycházející z centra grafu představují významnost odchylek, kdy body pod liniemi jsou významně odchýlené ($P \leq 0,05$), nad liniemi nevýznamně ($P > 0,05$). Půlkruh vymezuje úspěšný výsledek (hladina spolehlivosti 90 % pro RE), obdélník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

Tab. 5 Výsledky výkonostního testu (PT) analytické způsobilosti stanovení koncentrace kyseliny citrónové (KC; difference v mmol/l) v mléce metodou MIR-FT z NRL-SM

u	d	sd	RE	t	význ.
322-KM	0,603	0,083	0,609	23,04	***
323-KM	1,154	0,142	1,163	25,77	***
321-KM	-1,757	0,184	1,767	30,24	***
D	1,172	0,136			
sD	1,2629	0,0414			

→ diskriminační limit úspěšnosti účastníků (90 %)

Obr. 4 Graf Euklidické vzdálenosti výkonostního testu (PT) analytické způsobilosti stanovení kyseliny citrónové (KC) v mléce metodou MIR-FT z NRL-SM (Tab. 5)



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

Tab. 6 Statistické charakteristiky (průměr x a směrodatná odchylka sx) hodnot d a sd souborů všech účastníků (I) z PT (pro KAS, STP, VMK a KC)

Ukazatel		d	sd
KAS	n	18	18
	x	0,0086	0,0182
	sx	0,0724	0,0063
STP	n	54	54
	x	-0,0028	0,0369
	sx	0,0296	0,0246
VMK	n	97	97
	x	0,0503	0,4351
	sx	0,5158	0,2686
KC	n	67	67
	x	-0,1622	0,3637
	sx	1,3598	0,2821

n = počet účastníků všech PT; x = aritmetický průměr; sx = směrodatná odchylka; d = průměrná difference LAB-REF (laboratoř – referenční hodnota); sd = směrodatná odchylka průměru individuálních rozdílů

Tab. 7 Statistické charakteristiky (průměr x a směrodatná odchylka sx) hodnot d a sd souborů jen úspěšných účastníků (II) vybraných z PT (pro KAS, STP, VMK a KC)

Ukazatel		d	sd
KAS	n	13	13
	x	-0,0154	0,0178
	sx	0,0361	0,0069

Ukazatel		d	sd
STP	n	43	43
	x	-0,0025	0,0301
	sx	0,0204	0,0172
VMK	n	68	68
	x	-0,0364	0,3237
	sx	0,3465	0,1410
KC	n	46	46
	x	0,6264	0,3229
	sx	0,7032	0,2925

Tab. 8 Modifikace u vzorků syrového kravského mléka v pozici referenčních standardů pro kalibrace nebo kontrolních vzorků pro výkonnostní testy k vytvoření potřebné hodnotové škály (variačního rozpětí) u metod MIR a zejména MIR-FT v Národní referenční laboratoři pro syrové mléko Rapotín

Měřená složka mléka	Referenční vzorky (kalibrace)	Kontrolní vzorky (výkonnostní test)	Způsob modifikace a validovaný zdroj postupu
Tuk	Ano	Ano	Snížení odstátím mléka (spodní objem). Snížení ředěním mléka kompozicí specifického roztoku. Zvýšení odstátím mléka (horní objem). * 2010 b, 2011 c.
Hrubé bílkoviny	Ano	Ano	Snížení ředěním mléka kompozicí specifického roztoku. Zvýšení výběrem specifického stáda dojnic s dobrou výživou energií. Mírné zvýšení odstátím mléka (spodní objem). * 2010 b, 2011 c.
Kasein	Ano	Ano	Snížení ředěním mléka kompozicí specifického roztoku. Zvýšení výběrem specifického stáda dojnic s dobrou výživou energií. Mírné zvýšení odstátím mléka (spodní objem). * 2010 a, b, 2011 c, d.
Laktóza	Ano	Ano	Snížení ředěním mléka kompozicí specifického roztoku. Mírné zvýšení odstátím mléka (spodní objem). * 2010 b, 2011 c.
Sušina tukuprostá	Ano	Ano	Snížení ředěním mléka kompozicí specifického roztoku. Zvýšení výběrem specifického stáda dojnic s dobrou výživou energií. Mírné zvýšení odstátím mléka (spodní objem). * 2010 b, 2011 c.
Močovina	Ne	Ano	Zvýšení umělým přídatkem (jen MIR-FT). Mírné zvýšení odstátím mléka (spodní objem). * 2008 b, 2009 a, 2011 c; Hering <i>et al.</i> , 2008.
Kyselina citrónová	Ano	Ne	Zvýšení umělým přídatkem (jen MIR-FT). * 2009 b.
Volné mastné kyseliny	Ano	Ne	Zvýšení mechanickou námahou mléka a výběrem specifického stáda s nedostatečnou výživou krav energií. * 2008 a, c, 2009 c. Genčurová <i>et al.</i> , 2009.
Bod mrznutí mléka	Ne	Ano	Snížení přídatkem NaCl do vzorků vody. Zvýšení přídatkem vody do vzorků mléka. * 2009 a.
Aceton	Ano	Ano	Zvýšení výběrem specifického stáda a krav s nedostatečnou výživou energií v počátku laktace. * 2011 a, d.

* Hanuš *et al.*.

Kontakní adresa

Doc. Dr. Ing. Oto Hanuš
 Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o.
 Rapotín, Výzkumníků 267, 788 13 Vikýřovice
 Tel.: 583 392 157, fax: 583 392 129
 Email: oto.hanus@vuchs.cz