

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

Katedra hygieny a bezpečnosti potravín

**Optimalizácia referenčnej metódy stanovenia počtu
somatických buniek v surovom kravskom mlieku**

Autoreferát dizertačnej práce
na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae doctor
v študijnom programe doktorandského štúdia Technológia potravín
v študijnom odbore: 6.1.13
Technológia potravín

Ing. Peter Zajác

Nitra, 2006

Dizertačná práca bola vypracovaná v externej forme doktorandského štúdia na Štátnom veterinárnom a potravinovom ústave v Nitre, v Národnom referenčnom laboratóriu pre mlieko a mliečne výrobky a Katedre hygieny a bezpečnosti potravín Fakulty biotechnológie a potravinárstva Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorand: **Ing. Peter Zajác**

Štátny veterinárny a potravinový ústav Nitra, Národné referenčné laboratórium pre mlieko a mliečne výrobky, Akademická 3, 949 01 Nitra.

Katedra hygieny a bezpečnosti potravín
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: **prof. MVDr. Jozef Sokol, DrSc.**

Katedra hygieny a bezpečnosti potravín
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Školiteľ špecialista: **doc. Ing. Jozef Golian, Dr.**

Katedra hygieny a bezpečnosti potravín
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Oponenti: **prof. Ing. Jaroslav Kováčik, CSc.,**

Katedra fyziológie živočíchov
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

doc. MVDr. Eva Dudríková, CSc.,

Katedra hygieny a technológie potravín
Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

Ing. Karol Herian, CSc.,
Emeritný pracovník,
Výskumný ústav mliekarenský a.s. Žilina

Autoreferát bol rozoslaný dňa:

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Obhajoba dizertačnej práce sa koná dňa o hod. pred komisiou pre obhajobu dizertačnej práce študijného doktorandského štúdia Technológia potravín, študijného odboru 6.1.13. Spracovanie poľnohospodárskych produktov na Fakulte biotechnológie a potravinárstva, Slovenskej poľnohospodárskej univerzite v Nitre.

Miesto konania: Katedra hygieny a bezpečnosti potravín,
Fakulta biotechnológie a potravinárstva,
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Miestnosť:

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na Dekanáte Fakulty biotechnológie a potravinárstva.

Predseda komisie pre obhajoby v študijnom programe doktorandského štúdia Technológia potravín a študijnom odbore 6.1.13 Spracovanie poľnohospodárskych produktov

.....
prof. Ing. Zdenka Muchová, CSc.

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

ABSTRAKT

Mastitída patrí medzi najdôležitejšie ochorenia hovädzieho dobytku. Hlavným indikátorom a diagnostickým štandardom pri zisťovaní mastitídy sú somatické bunky. V súčasnosti sa na hodnotenie počtu somatických buniek v bežnej praxi používa metóda, podľa STN EN ISO 13366-3 (2001) Fluorescenčná optická elektronická metóda. Ako referenčná metóda sa používa metóda podľa STN EN ISO 13366-1 (2001) Mikroskopická metóda za použitia farbiva metylénovej modrej alebo etídium bromidu.

V experimente 1 sme overili možnosť využitia referenčnej metódy s použitím etídium bromidu. Metódu sme porovnali s ďalšou mikroskopickou metódou, ktorej farbenie bolo založené na princípe farbenia používanom u prístrojov typu Fossomatic. Pri farbení sa použil etídium bromid, farbiaci roztok sa pridával priamo do vzorky mlieka a teplota počas farbenia bola modifikovaná na 100 °C. Štatisticky zistený rozdiel medzi metódami bol 21 000 SB . ml⁻¹. Z empirických poznatkov vyplýva, že metódy majú viaceré nedostatky, predovšetkým metodika počítania jadier somatických buniek a výpočet môžu výrazne ovplyvniť výsledok analýzy.

V nadväznosti na experiment 1 sme vykonali experiment 2, v ktorom sme sa zamerali na vývoj sekundárneho referenčného materiálu s presným počtom somatických buniek. Referenčný materiál bol skúšaný v troch laboratóriách. Referenčný materiál s nízkym počtom somatických buniek (233 500 SB . ml⁻¹) bol stabilný počas celého experimentu. Pri skúšaní referenčného materiálu s vysokým počtom somatických buniek (454 625 SB . ml⁻¹) bol zaznamenaný mierny vzostup počtu somatických buniek v laboratóriu č. 1 a v laboratóriu č. 2. V laboratóriu č. 3 bol zaznamenaný pokles počtu somatických buniek.

V experimente 3 sme navzájom porovnali výsledky piatich mikroskopických metód stanovenia počtu somatických buniek a inštrumentálnej metódy. Zistili sme, že výsledky metód sa v priemere významne líšia. Výsledky stanovené modifikovaným pracovným postupom návrhu normy ISO/WD 13366-1 / IDF 148-1 pri použití etídium bromidu a farbení pri 100 °C boli o 50 000 SB . ml⁻¹ nižšie v porovnaní s výsledkami stanovenými pri farbení metylénovou modrou. Výsledky stanovené pracovným postupom návrhu normy ISO/WD 13366-1 IDF 148-1 pri použití etídium bromidu a farbení pri 50 °C boli o 130 000 SB . ml⁻¹ nižšie v porovnaní s výsledkami stanovenými pri farbení metylénovou modrou.

Kľúčové slová: somatické bunky, etídium bromid, mikroskopická metóda, mlieko, epifluorescencia

ABSTRACT

Mastitis is one of the most important diseases of dairy cattle. Somatic cells are the main indicator and diagnostic standard for determination of mastitis disease. In the praxes, for routine determination of somatic cell count an instrumental fluoro-opto-electronic method according to EN ISO 13366-3 (2001) is used. The reference method is standard ISO 13366-1 (2001) Milk – Enumeration of somatic cells – part 1: Microscopic method, staining with methylene blue or ethidium bromide.

In the experiment no. 1 we have verified the above mentioned reference method with ethidium bromide staining. We compared this method with other microscopic method which principle of staining copied the principle of staining in Fossomatic instruments. Staining was performed with ethidium bromide, staining solution was directly added to the milk sample and the temperature during staining was modified to 100 °C. The statistical difference between methods was 21 000 SC . ml⁻¹. Both methods have several limitations, mostly that the methodology of somatic cells nuclei counting and calculation can affect the results markedly.

Consecutively to the experiment no. 1 we performed the experiment no. 2, where we focused on the development of the secondary reference material with accurate somatic cells counts. The reference material was analysed at three laboratories. Reference material with low level of somatic cells (233 500 SC . ml⁻¹) was stable during the whole period of experiment. Results from the laboratory no. 1 and laboratory no. 2 prove that the reference material with high level of somatic cells (454 625 SC . ml⁻¹) show an increase of somatic cells, while the results from laboratory no. 3 indicates a decrease of somatic cells count.

During the experiment no. 3 we compared the results of five different microscopic methods for somatic cells counting and an instrumental method. We experienced a big difference between those methods. The results determined by modified working procedure of the ISO/WD 13366-1 / IDF 148-1 draft with ethidium bromide staining and the temperature of staining 100 °C were lower by 50 000 SC . ml⁻¹ in comparison with results determined by methylene blue staining. The results determined by working procedure of ISO/WD 13366-1 IDF 148-1 draft with ethidium bromide staining and the temperature of staining 50 °C, were lower by 130 000 SC . ml⁻¹ while compared to the results determined by methylene blue staining.

Key words: somatic cells, ethidium bromide, direct microscopic method, milk, DMSCC, epifluorescence

ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV

A.I.A. L.S.L. – Associazione Italiana Allevatori – Laboratorio Standard Latte, Via dell'Industria 24, 000 57 Maccarese, Rím, Taliansko, **EtBr** – etídium bromid, **ICAR** – International Committee for Animal Recording, **IDF** – International Dairy Federation, **ISO** –International Standard Organisation, **NRLM** – Národné referenčné laboratórium pre mlieko a mliečne výrobky, Štátny veterinárny a potravinový ústav Nitra, **SB** – somatické bunky, **SC** – somatic cells

OBSAH

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | <u>ÚVOD</u> | 7 |
| 1.1 | <u>Masstitída</u> | 7 |
| 1.1.1 | <u>Vplyvy vyvolávajúce masstitídu</u> | 7 |
| 1.2 | <u>Vplyv masstitídy na produkciu, zloženie a technologickú kvalitu mlieka a mliečnych výrobkov</u> | 7 |
| 1.3 | <u>Nebezpečenstvo asociované s konzumáciou masstitídneho mlieka</u> | 7 |
| 1.4 | <u>Právne normy a počet somatických buniek</u> | 8 |
| 1.5 | <u>Charakteristika somatických buniek</u> | 8 |
| 1.5.1 | <u>Bunky pochádzajúce z krvi</u> | 8 |
| 1.5.1.1 | <u>Bunky bieleho krvného obrazu</u> | 8 |
| 1.5.1.2 | <u>Bunky červeného krvného obrazu</u> | 9 |
| 1.5.2 | <u>Bunky pochádzajúce z mliečnej žľazy</u> | 9 |
| 1.6 | <u>Stanovenie somatických buniek v surovom kravskom mlieku</u> | 9 |
| 1.6.1 | <u>Stanovenie počtu somatických buniek prietokovou cytometriou (prístrojom Fossomatic)</u> | 10 |
| 1.6.2 | <u>Referenčná metóda stanovenia počtu somatických buniek</u> | 10 |
| 2 | <u>CIEĽ PRÁCE</u> | 10 |
| 2.1 | <u>Cieľ experimentu 1 - stanovenie počtu somatických buniek v surovom kravskom mlieku referenčnou metódou</u> | 10 |
| 2.2 | <u>Cieľ experimentu 2 - príprava sekundárnych referenčných materiálov</u> | 11 |
| 2.3 | <u>Cieľ experimentu 3 - porovnanie výsledkov mikroskopických metód</u> | 11 |
| 3 | <u>MATERIÁL A METODIKA</u> | 12 |
| 3.1 | <u>Experiment 1</u> | 12 |
| 3.1.1 | <u>Materiál</u> | 12 |
| 3.1.2 | <u>Použité metódy</u> | 12 |
| 3.1.3 | <u>Štatistické vyhodnotenie experimentu 1</u> | 12 |
| 3.1.4 | <u>Výpočet neistôt meraní</u> | 12 |
| 3.2 | <u>Experiment 2</u> | 12 |
| 3.2.1 | <u>Materiál</u> | 12 |
| 3.2.2 | <u>Použité metódy</u> | 12 |
| 3.2.3 | <u>Štatistické vyhodnotenie experimentu 2</u> | 13 |
| 3.3 | <u>Experiment 3</u> | 13 |
| 3.3.1 | <u>Materiál</u> | 13 |
| 3.3.2 | <u>Použité metódy</u> | 13 |
| 3.3.3 | <u>Štatistické vyhodnotenie experimentu 3</u> | 13 |
| 4 | <u>VÝSLEDKY</u> | 14 |
| 4.1 | <u>Vyhodnotenie experimentu 1</u> | 14 |
| 4.2 | <u>Vyhodnotenie experimentu 2</u> | 14 |
| 4.3 | <u>Vyhodnotenie experimentu 3</u> | 16 |
| 5 | <u>NÁVRH NA VYUŽITIE</u> | 17 |
| 6 | <u>ZÁVER</u> | 18 |
| 7 | <u>POUŽITÁ LITERATÚRA</u> | 20 |
| 8 | <u>PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU</u> | 22 |

1 ÚVOD

1.1 Mastitída

Drahošová a Drončovský (2004) uvádzajú, že mastitída je zápalové ochorenie mliečnej žľazy, ktoré je charakterizované fyzikálnymi, chemickými a mikrobiálnymi zmenami, ako aj vzostupom počtu somatických buniek a ďalšími zmenami v zložení mlieka. Patrí medzi ekonomicky najzávažnejšie ochorenia hospodárskych zvierat.

Mastitída je zápalové ochorenie mliečnej žľazy a somatické bunky sú vo všeobecnosti štandardom pri jej diagnostikovaní (**Pyörälä, 2003**).

1.1.1 Vplyvy vyvolávajúce mastitídu

Podľa **Drahošovej a Drončovského (2004)** mastitídu môžu vyvolať neinfekčné alebo infekčné vplyvy. Za neinfekčné vplyvy sa považujú traumatické, mechanické, chemické, toxické a fyzikálne vplyvy. Infekčné vplyvy sú mikrobiálneho pôvodu a v praxi sa s nimi stretávame najčastejšie.

Infekčná mastitída patrí k polyfaktoriálnym ochoreniam, na vznik a šírení ktorého sa zúčastňujú tri biosystémy: makroorganizmus dojnice, vonkajšie prostredie a infekčný činiteľ (**Burďová et al., 1999; Drahošová a Drončovský, 2004; Kováč et al., 2001**).

1.2 Vplyv mastitídy na produkciu, zloženie a technologickú kvalitu mlieka a mliečnych výrobkov

Pokles produkcie mlieka u mastitídnych dojníc závisí od druhu prítomného patogénneho mikroorganizmu. K poklesu dojivosti dochádza už niekoľko týždňov pred diagnostikovaním klinickej mastitídy (**Gröhn et al., 2004**).

Mastitída výrazne vplýva na zloženie mlieka, a tým na jeho technologickú kvalitu ako aj kvalitu finálnych mliečnych výrobkov. Vplyvom mastitídy sa zvyšuje počet somatických buniek v mlieku, menia sa zmyslové vlastnosti mlieka, jeho zloženie a fyzikálne – chemické znaky kvality (**Drahošová a Drončovský, 2004**).

Gerald, 2001 uvádza, že ak je počet somatických buniek v bazénovom mlieku $500\,000 \cdot \text{ml}^{-1}$, v stáde je 16 % infikovaných štvrtiek vemien a produkcia mlieka klesá o 6 %.

1.3 Nebezpečenstvo asociované s konzumáciou mastitídneho mlieka

V súvislosti s mastitídou sa mení zloženie mlieka a dochádza k výraznému vzostupu počtu somatických buniek (**Gerald, 2001**).

Zvýšený počet somatických buniek sám o sebe nie je rizikovým faktorom pre ľudské zdravie, ale je nevyhnutné brať do úvahy tú skutočnosť, že v tomto ukazovateli sa odráža celkový zdravotný stav dojnice (**Smith, 1996**).

Väčšina zápalov mliečnej žľazy je spôsobená prítomnosťou mikroorganizmov a teda infekciou (**Harmon, 1994**).

Prítomnosť mikroorganizmov v surovom kravskom mlieku je sama o sebe riziková. Riziko sa však stupňuje s prítomnosťou ich toxínov (**Zajác et al., 2005**).

Pri liečbe mastitídy sa používa široké spektrum veterinárnych liečiv, predovšetkým antibiotík. Rezíduá týchto látok predstavujú veľké riziko pre zdravie človeka. Pri vyššom počte somatických buniek sa zvyšuje riziko z prítomnosti antibiotík v surovom kravskom mlieku (**Ruegg a Tabone, 2000**).

Mikroorganizmy, predovšetkým patogénne baktérie a ich toxické produkty ako aj veterinárne liečivá predstavujú riziko, ktoré existuje v paralele so zvýšeným počtom somatických buniek. Toto riziko môže nepriaznivo ovplyvniť ľudské zdravie (**Zajác et al., 2005**).

1.4 Právne normy a počet somatických buniek

Legislatíva Európskej únie upravuje počet somatických buniek prostredníctvom **Nariadenia č. 853 (2004)** Európskeho parlamentu a Rady z 29. apríla 2004, ktoré stanovuje špecifické hygienické pravidlá pre potraviny živočíšneho pôvodu. Kritérium pre počet somatických buniek v surovom kravskom mlieku v bazénovej vzorke je maximálne 400 000 somatických buniek . ml⁻¹.

1.5 Charakteristika somatických buniek

Somatické bunky pozostávajú z viacerých typov buniek zahŕňajúc polymorfonukleárne leukocyty, makrofágy, lymfocyty a epitelové bunky. Počet somatických buniek v mlieku sa prudko zvyšuje v počiatočných fázach zápalu vena a znižuje sa až postupným liečením. Somatické bunky, predovšetkým neutrofilné leukocyty hrajú dôležitú obrannú úlohu voči infekcii vena. Ich hlavnou úlohou je fagocytovať a zničiť infekčné agens (**Grieger a Holec et al., 1990**).

Podľa Medzinárodnej mliekarenskej federácie má mlieko zdravej štvrtky mliečnej žľazy obsahovať menej ako 250 000 somatických buniek . ml⁻¹.

1.5.1 Bunky pochádzajúce z krvi

Sekrečný parenchým mliečnej žľazy je čiastočne priepustný pre bunky krvi. Táto priepustnosť sa zvyšuje za nenormálnych podmienok sekrécie mlieka (**Grieger a Holec et al., 1990**).

1.5.1.1 Bunky bieleho krvného obrazu

Bunky bieleho krvného obrazu popisuje **Kováčik et al. (1996)**. Podľa veľkosti, tvaru jadra a schopnosti farbenia sa možno u leukocytov rozlíšiť monocytov (makrofágy), lymfocyty (lymfocyty T, lymfocyty B, nešpecializované lymfocyty) a granulocyty (eozinofily, neutrofilny, bazofily).

Monocyty sú bunky veľké 15 – 20 µm, s obličkovitým alebo laločnatým jadrom, excentricky uloženým. Lymfocyty sú veľké 6 – 18 µm, vyznačujú sa veľkým, guľatým, modro zafarbeným jadrom, vyplňajúcim takmer celú bielu krvinku. Granulocyty sú bunky, ktoré majú v mladom štádiu tyčinkové jadro, na ktorom sa neskôr objavujú zlúčeniny. Jadro sa starnutím rozpadá na 2 – 5 častí (segmentované). Veľkosť granulocytov je 10 – 20 µm. Neutrofilné leukocyty sa zo všetkých typov leukocytov

v mlieku vyskytujú najčastejšie. Stretávame sa s nimi v štádiu segmentovaných jadier, spravidla sú segmentované na 2 až 3 diely. U týchto buniek je vyvinutá fagocytárna schopnosť (Grieger a Holec et al., 1990).

1.5.1.2 Bunky červeného krvného obrazu

Sú zastúpené erytrocytmi. Erytrocyty pri príprave preparátu za použitia bežných farbív nedajú zistiť. Dajú sa zafarbiť špeciálnymi metódami a zisťujeme ich pri ťažkých formách zápalu mliečnej žľazy, pri poranení mliečnej žľazy, najmä pri poranení strukových vývodov (Grieger a Holec et al., 1990).

1.5.2 Bunky pochádzajúce z mliečnej žľazy

Dlaždicový vrstevnatý epitel sa nachádza na koži na povrchu vemena, struku a strukových vývodov. Bunky dlaždicového vrstevnatého epitelu majú tvar oválnych alebo polygonálne zvrásnených útvarov s príležitostne sa vyskytujúcimi fragmentmi jadier.

Cylindrický epitel pochádza z mliečnych cisterien a väčších mliekovodov. Je dvojvrstvový, bunky sú oválne až obdĺžnikovité, s excentricky uloženým jadrom.

Epitelové bunky pochádzajú z drobných mliekovodov a sekrečných alveol. Majú guľovitý, až mierne oválny tvar a dobre sa farbiace excentricky uložené jadro. (Grieger a Holec et al., 1990).

1.6 Stanovenie somatických buniek v surovom kravskom mlieku

Podľa International Committee for Animal Recording, Working Group on Milk Testing Laboratories (ICAR, 2005), sa pre stanovenie počtu somatických buniek môžu používať nasledovné metódy:

Analytické laboratórne metódy na stanovenie počtu somatických buniek

Tabuľka č. 1

| Medzinárodná – referenčná metóda | |
|--|---|
| Mikroskopické stanovenie počtu somatických buniek | ISO 13366-1 (IDF 148) STN EN ISO 13366-1 |
| Štandardizované rutinné metódy | |
| Metóda elektronického počítania častíc (Coulter Counter)* | ISO 13366-2 (IDF 148), STN EN ISO 13366-2 (bola zrušená) |
| *Po ukončení revízie normy ISO 13366 (IDF 148) bude táto metóda zrušená. | |
| Fluoro-opto-elektronická metóda (Rotačné disky) | ISO 13366-3 (IDF 148), STN EN ISO 13366-3 AOAC 978.26 |
| Fluoro-opto-elektronická metóda (Prietoková cytometria)** | ISO 13366 (IDF 148) STN EN ISO 13366-3 |
| **Po ukončení revízie normy ISO 13366 (IDF 148) bude súčasťou tejto normy. | |

| Rutinné inštrumentálne metódy používané v členských krajinách ICAR | | |
|---|------------------------|--|
| Rátanie častíc | Coultronic (UK) | Coulter counter |
| Fluoro-opto-elektronická metóda založená na diskovej cytometrii. | Foss Electric (DK) | Fossomatic 90, 180, 215, 250, 360, 400 |
| Fluoro-opto-elektronická metóda založená na prietokovej cytometrii. | Anadis (F) | Somatic Cell Counter 300, 500 |
| | Bentley (USA) | Somacount 150, 300, 500 |
| | Chemunex (D) | Partec CA 11 |
| | Delta Instruments (NL) | Somascope MKII Manual MKII Auto 200 MKII Auto 400 |
| | Foss Electric (DK) | Fossomatic 5000, CombiFoss 5000, CombiFoss 6000 FC |

(ICAR 2005)

1.6.1 Stanovenie počtu somatických buniek prietokovou cytometriou (prístrojom Fossomatic)

Princíp stanovenia prístrojom je založený na zafarbení somatických buniek, ktoré sú následne elektronicky počítané.

Prietoková cytometria je založená na princípe priechodu veľmi malého množstva vzorky pod počítacou jednotkou prístroja.

1.6.2 Referenčná metóda stanovenia počtu somatických buniek

Referenčnou metódou je mikroskopické stanovenie počtu somatických buniek. Vzorka mlieka sa naniesie na podložné sklíčko tak, aby vznikol tenký film. Film sa vysuší, zafarbí a nasleduje mikroskopické počítanie zafarbených buniek. Spočítaný počet buniek na definovanej ploche sa násobí pracovným faktorom a tak sa získa počet buniek v 1 ml (STN EN ISO 13366-1, 2001).

2 CIEĽ PRÁCE

2.1 Cieľ experimentu 1 - stanovenie počtu somatických buniek v surovom kravskom mlieku referenčnou metódou.

1. Zaviesť do praxe referenčnú metódu stanovenia počtu somatických buniek.
2. Porovnať metódu uvedenú v norme STN EN ISO 13366-1 (2001) s modifikovanou metódou popísanou **Vermuntom et al. (1995)**. Modifikácia tejto metódy bola vykonaná v NRLM.
3. Vypočítať neistoty merania pre obe metódy.

2.2 Cieľ experimentu 2 - príprava sekundárnych referenčných materiálov

Preskúmať možnosť výroby sekundárnych referenčných materiálov (referenčných vzoriek) s nízkym a vysokým počtom somatických buniek podľa postupu uvedeného v práci **Vermunta et al. (1995)**, určených pre dennú kontrolu automatických prístrojov na stanovenie počtu somatických buniek vo vzorkách mlieka (prístroje typu Fossomatic).

1. Pripraviť a testovať kvalitu referenčnej vzorky s nízkym počtom somatických buniek v NRLM.
2. Pripraviť a testovať kvalitu referenčnej vzorky s vysokým počtom somatických buniek v NRLM.
3. Pripraviť referenčné vzorky s nízkym a vysokým počtom somatických buniek a testovať ich kvalitu v reálnych laboratórnych podmienkach, porovnať výsledky stanovené v troch laboratóriách.

2.3 Cieľ experimentu 3 - porovnanie výsledkov mikroskopických metód

Porovnať výsledky stanovené nasledovnými metódami:

A

STN EN ISO 13366-1 (2001) Mlieko - stanovenie počtu somatických buniek, Časť 1: Mikroskopická metóda (referenčná metóda) – **farbenie etídium bromidom** - výsledky NRLM.

B

ISO/WD 13366-1 / IDF 148-1 (2005) Mlieko – stanovenie počtu somatických buniek – Časť 1: Mikroskopická metóda (referenčná metóda) – (modifikovaná) **farbenie etídium bromidom pri teplote 100 °C** – výsledky NRLM.

C

ISO 13366-3 (1997) Mlieko, Stanovenie počtu somatických buniek, Časť 3: Fluorescenčná optická elektronická metóda – **prístroj Fossomatic** (prevádzková metóda) – výsledky A.I.A.-L.S.L. Rím.

D

ISO/WD 13366-1 / IDF 148-1 (2005) Mlieko – stanovenie počtu somatických buniek – Časť 1: Mikroskopická metóda (referenčná metóda) – **farbenie etídium bromidom pri teplote 50 °C** – výsledky NRLM.

E

ISO/WD 13366-1 / IDF 148-1 (2005) Mlieko – stanovenie počtu somatických buniek – Časť 1: Mikroskopická metóda (referenčná metóda) – **farbenie metylénovou modrou** – výsledky kolaboratívnej štúdie.

F

ISO/WD 13366-1 / IDF 148-1 (2005) Mlieko – stanovenie počtu somatických buniek – Časť 1: Mikroskopická metóda (referenčná metóda) – **farbenie etídium bromidom** – výsledky kolaboratívnej štúdie.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Experiment 1

3.1.1 Materiál

Na skúšanie sa použili iba vzorky surového kravského mlieka. Odber vzoriek sa realizoval podľa **STN EN ISO 707 (2001)**. Vzorky surového kravského mlieka pochádzali prevažne z vybraného chovu RD Rumanová.

3.1.2 Použité metódy

Metóda A: **STN EN ISO 13366-1 (2001)** Mlieko, Stanovenie počtu somatických buniek časť 1: Mikroskopická metóda.

Metóda B: metóda podľa **Vermunta et al. (1995)**, modifikovaná na základe našich pozorovaní a empirických skúseností. Pri pracovnom kroku farbenia somatických buniek bola zmenená teplota 50 °C teplotou 100 °C, nasledovalo prídanie farbiaceho roztoku, farbenie počas 1 minúty za stáleho miešania a vychladenie laboratórnej vzorky na teplotu 20 °C.

Metóda C: **STN EN ISO 13366-3 (2001)** Mlieko, Stanovenie počtu somatických buniek, časť 3: Fluorescenčná optická elektronická metóda.

3.1.3 Štatistické vyhodnotenie experimentu 1

Na vyhodnotenie získaných výsledkov sa použila dvojfaktorová analýza rozptylu (ANOVA) bez interakcií. Na mnohonásobné porovnanie metód sa použil Tukeyov test a Sheffeho test. Pre vzájomné porovnanie metód boli vypočítané korelačné koeficienty. Výpočet sa uskutočnil v profesionálnom štatistickom programe STATISTICA CZ.

3.1.4 Výpočet neistôt meraní

Výpočet neistôt meraní metód sa uskutočnil podľa odbornej literatúry (**Kazda, 2006; Ealík, 2006; Rimarčík, 2006; Urban 2006; Koller, 2002; Halaj, 2004; Eurachem, 2000; SNAS, 1997**). Zo zistených údajov sa vypočítala štandardná odchýlka, variačný koeficient, neistota typu A, neistota typu B, kombinovaná štandardná neistota typu C a rozšírená neistota merania.

3.2 Experiment 2

3.2.1 Materiál

Na skúšanie sa použili iba vzorky surového kravského mlieka. Odber vzoriek sa realizoval podľa **STN EN ISO 707 (2001)**. Vzorky surového kravského mlieka pochádzali prevažne z vybraného chovu RD Rumanová.

3.2.2 Použité metódy

Príprava sekundárnych referenčných materiálov sa vykonala podľa **Vermunta et al. (1995)**. Na skúšanie počtu somatických buniek sa použili metódy uvedené v bode 3.1.2. Experiment bol rozdelený nasledovne:

1. Príprava a skúšanie kvality referenčnej vzorky s nízkym počtom somatických buniek.
2. Príprava a skúšanie kvality referenčnej vzorky s vysokým počtom somatických buniek.
3. Príprava referenčných vzoriek s nízkym a vysokým počtom somatických buniek, skúšanie kvality pripravených referenčných vzoriek v reálnych laboratórnych podmienkach, porovnanie výsledkov stanovených v troch laboratóriách.

3.2.3 Štatistické vyhodnotenie experimentu 2

Pre vyhodnotenie výsledkov experimentu sme vypočítali aritmetický priemer meraní počtu somatických buniek, štandardnú odchýlku a variačný koeficient. Priemerné výsledky sa porovnali voči referenčnej hodnote, ktorá sa určila na začiatku experimentu. Priemerné výsledky sa ďalej porovnali voči internému limitu, ktorý bol daný štandardnou odchýlkou, ktorá sa stanovila na začiatku experimentu pri určovaní referenčnej hodnoty počtu somatických buniek v pripravovanej referenčnej vzorke. Priemerné výsledky sa taktiež porovnali voči externému limitu, ktorý sa určil odborným odhadom a predstavoval približne dvojnásobok štandardnej odchýlky vypočítanej z hodnôt nameraných prístrojom Fossomatic 5000 pri určovaní počtu somatických buniek (18 výsledkov) v pripravovanej referenčnej vzorke. Priemerné výsledky jednotlivých meraní sa zoradili za sebou na časovú os v podobe grafu a určil sa trend za obdobie experimentu (stabilita referenčného materiálu). Výsledky druhej fázy experimentu 2 sa okrem vyššie uvedeného postupu porovnali navzájom. Výsledky sa porovnali s výsledkami zistenými **Vermuntom et al. (1995)**.

3.3 Experiment 3

3.3.1 Materiál

Na skúšanie sa použili vzorky mlieka konzervované 0,02 % w/w bronopolom. Vzorky boli pripravené v A.I.A. Laboratorio Standard Latte, Via dell' Industria 24, 00057 Maccarese, Rím, Taliansko, ktoré organizovalo medzinárodnú kolaboratívnu štúdiu stanovenia počtu somatických buniek v surovom kravskom mlieku.

3.3.2 Použité metódy

Na skúšanie 16 vzoriek mlieka sa použili metódy A, B a D, uvedené v bode 2.3. Z každej vzorky sa pripravili 2 preparáty zvlášť pre každú metódu A, B a D (spolu 96 preparátov).

Výsledky metód A, B a D sa stanovili v NRLM. Výpočet sa realizoval podľa návrhu normy **ISO/WD 13366-1 IDF 148-1 (2005)**. Výsledky metódy C sa stanovili v AIA – Laboratorio Standard Latte v Ríme pomocou prístroja Fossomatic. Výsledky metódy E a F sa stanovili laboratóriami zúčastnenými v kolaboratívnej štúdií.

3.3.3 Štatistické vyhodnotenie experimentu 3

Na vyhodnotenie získaných výsledkov sa použila dvojfaktorová analýza rozptylu (ANOVA) bez interakcií. Na mnohonásobné porovnanie metód sa použil Tukeyov test a Sheffeho test. Pre vzájomné porovnanie metód boli vypočítané korelačné koeficienty. Výpočet sa uskutočnil v profesionálnom štatistickom programe STATISTICA CZ.

4 VÝSLEDKY

4.1 Vyhodnotenie experimentu 1

Výsledky metód A, B, C, sa významne líšia. Z porovnania priemerných výsledkov vyplýva, že najnižšie výsledky počtu somatických buniek boli stanovené metódou A, následne metódou C, a najvyššie výsledky počtu somatických buniek boli stanovené metódou B.

Výsledky stanovené metódou A boli o 21 000 somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ nižšie v porovnaní s výsledkami metódy B a o 11 000 somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ nižšie v porovnaní s výsledkami metódy C. Výsledky metódy B boli o 10 000 somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ vyššie v porovnaní s výsledkami metódy C.

Štatisticky zistený rozdiel medzi metódami A a C a rovnako B a C neprekračuje hodnotu 5 %, ktorá predstavuje variačný koeficient pri meraní na prístroji Fossomatic (metóda C) na hladine 300 000 somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$. Z uvedeného vyplýva, že metódy A a B sa môžu zaviesť do praxe.

Rozšírená neistota merania vypočítaná pre metódu A je 2 %, resp. 7 % v závislosti od použitého spôsobu počítania jadier somatických buniek.

Rozšírená neistota merania vypočítaná pre metódu B je 8 %, resp. 10 % v závislosti od použitého spôsobu počítania jadier somatických buniek.

4.2 Vyhodnotenie experimentu 2

Bod 1 experimentu 2 (Príprava a skúšanie kvality referenčnej vzorky s nízkym počtom somatických buniek)

Referenčná vzorka s nízkym počtom somatických buniek bola skúšaná počas obdobia 4. 3. 2004 až 16. 6. 2004. Referenčná vzorka si udržala kvalitatívne vlastnosti počas celej dĺžky experimentu. Bol zaznamenaný iba mierny vzostup počtu somatických buniek.

Vypočítaná hodnota opakovateľnosti merania na prístroji Fossomatic 5000, bola $\pm 9\,120$ somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$, táto hodnota predstavovala interný limit pre posudzovanie kvality referenčnej vzorky. Interný limit bol nepatrne prekročený iba pri dvoch meraniach. Externý limit bola hodnota $\pm 20\,000$ somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$. Externý limit bol odhadnutý zo štandardnej odchýlky vypočítanej z výsledkov nameraných na prístroji Fossomatic 5000 pri určovaní počtu somatických buniek v pripravovanej referenčnej vzorke a predstavoval dvojnásobok hodnoty štandardnej odchýlky. Externý limit nebol prekročený počas celej dĺžky experimentu.

Pracovný postup prípravy referenčnej vzorky s nízkym počtom somatických buniek je vhodný pre prípravu sekundárnych referenčných materiálov s presným počtom somatických buniek.

Bod 2 experimentu 2 (Príprava a skúšanie kvality referenčnej vzorky s vysokým počtom somatických buniek)

Referenčná vzorka s vysokým počtom somatických buniek bola skúšaná počas obdobia 11. 5. 2004 až 4. 8. 2004. Referenčná vzorka si neudržala kvalitatívne vlastnosti počas celej dĺžky experimentu. Bol zaznamenaný vzostup počtu somatických buniek.

Vypočítaná hodnota opakovateľnosti merania na prístroji Fossomatic 5000 bola $\pm 16\,203$ somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$, táto hodnota predstavovala interný limit pre posudzovanie kvality referenčnej vzorky. Interný limit bol nepatrne prekročený už 14 dní od začatia experimentu. Bolo pozorované zvýšenie počtu somatických buniek. Externý limit bola hodnota $\pm 30\,000$ somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$. Externý limit bol odhadnutý zo štandardnej odchýlky vypočítanej z výsledkov nameraných na prístroji Fossomatic 5000 pri určovaní počtu somatických buniek v pripravovanej referenčnej vzorke a predstavoval dvojnásobok hodnoty štandardnej odchýlky. Externý limit bol prekročený 37 dní od začatia experimentu.

Referenčné vzorky pripravené týmto pracovným postupom sa budú môcť použiť v praxi iba za toho predpokladu, že sa zvýši hodnota externého limitu za súčasného skrátenia doby úschovy referenčných vzoriek. Z výsledkov vyplýva, že doba úschovy referenčných vzoriek by mala byť maximálne jeden mesiac od ich prípravy.

Bod 3 experimentu 2 (Príprava referenčných vzoriek s nízkym a vysokým počtom somatických buniek, skúšanie kvality pripravených referenčných vzoriek v reálnych laboratórnych podmienkach, porovnanie výsledkov stanovených v troch laboratóriách)

Referenčná vzorka s nízkym počtom somatických buniek bola skúšaná počas obdobia 9. 2. 2005 až 11. 3. 2005 v troch akreditovaných skúšobných laboratóriách. Referenčná vzorka si udržala kvalitatívne vlastnosti počas celej dĺžky experimentu. Bol zaznamenaný veľmi mierny vzostup počtu somatických buniek v prípade laboratória č. 1. V laboratóriu č. 2 bol zaznamenaný nepatrný pokles počtu somatických buniek. V laboratóriu č. 3 bol zaznamenaný pokles počtu somatických buniek.

Vypočítaná hodnota opakovateľnosti merania na prístroji Fossomatic 5000 bola $\pm 10\,579$ somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$, táto hodnota predstavovala interný limit pre posudzovanie kvality referenčnej vzorky s nízkym počtom somatických buniek. Interný limit bol nepatrne prekročený iba pri jednom meraní v laboratóriu č. 3.

Hodnota reprodukovateľnosti stanovená z výsledkov meraní troch zúčastnených laboratórií bola v prípade referenčnej vzorky s nízkym počtom somatických buniek $\pm 10\,337$ somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$. Externý limit bola hodnota $\pm 20\,000$ somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$. Externý limit bol odhadnutý zo štandardnej odchýlky vypočítanej z výsledkov nameraných na prístroji Fossomatic 5000 pri určovaní počtu somatických buniek v pripravovanej referenčnej vzorke a predstavoval približne dvojnásobok hodnoty štandardnej odchýlky. Externý limit nebol prekročený počas celého experimentu.

Z výsledkov experimentu vyplýva, že všetky tri zúčastnené laboratóriá stanovili počet somatických buniek približne na tej istej hladine.

Kvalita referenčnej vzorky s nízkym počtom somatických buniek bola overená priamo v reálnych laboratórnych podmienkach. Kvalita referenčnej vzorky s nízkym počtom somatických buniek sa počas celej dĺžky experimentu v prípade výsledkov laboratória č. 1 a laboratória č. 2 nemenila. V laboratóriu č. 3 bolo zaznamenané zhoršenie kvality referenčnej vzorky, namerané výsledky mali klesajúcu tendenciu, ale až na jeden výsledok sa všetky nachádzali v tolerancii interného limitu.

Nami použitý pracovný postup prípravy referenčnej vzorky s nízkym počtom somatických buniek je vhodný pre prípravu sekundárnych referenčných materiálov s presným počtom somatických buniek.

Referenčná vzorka s vysokým počtom somatických buniek bola skúšaná počas obdobia 9. 2. 2005 až 11. 3. 2005. Z výsledkov meraní laboratória č. 1 a laboratória č. 2 vyplýva, že referenčná vzorka si zachovala kvalitatívne vlastnosti počas celej dĺžky experimentu.

Bol zaznamenaný mierny vzostup počtu somatických buniek v laboratóriu č. 1 a laboratóriu č. 2. V laboratóriu č. 3 bol zaznamenaný pokles počtu somatických buniek.

Vypočítaná hodnota opakovateľnosti merania na prístroji Fossomatic 5000 bola $\pm 14\,997$ somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$, táto hodnota predstavovala interný limit pre posudzovanie kvality referenčnej vzorky.

V laboratóriu č. 1 tri výsledky prekročili interný limit, ostatné výsledky boli v tolerancii stanoveného interného limitu. Žiadny výsledok laboratória 1 neprekročil externý limit. V laboratóriu č. 2 jeden výsledok prekročil stanovený interný limit, ostatné výsledky boli v tolerancii stanoveného interného limitu. Laboratórium č. 1 a laboratórium č. 2 stanovili počet somatických buniek na tej istej hladine. Značná časť výsledkov meraní laboratória č. 3 sa nachádzala pod hranicou interného limitu a výsledky piatich meraní boli pod hranicou externého limitu. Laboratórium č. 3 v porovnaní s laboratóriami č. 1 a č. 2 stanovilo počet somatických buniek na hladine približne o 30 000 somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ nižšej.

Hodnota reprodukovateľnosti stanovená z výsledkov meraní všetkých troch laboratórií bola $\pm 21\,802$ somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$.

Externý limit bola hodnota $\pm 30\,000$ somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$. Externý limit bol odhadnutý zo štandardnej odchýlky vypočítanej z výsledkov nameraných na prístroji Fossomatic 5000 pri určovaní počtu somatických buniek v pripravovanej referenčnej vzorke a predstavoval približne dvojnásobok hodnoty štandardnej odchýlky. Externý limit nebol prekročený v prípade výsledkov laboratória č. 1 a laboratória č. 2. Päť výsledkov meraní laboratória č. 3 sa nachádzalo pod hranicou externého limitu.

Kvalita referenčnej vzorky s vysokým počtom somatických buniek bola overená priamo v reálnych laboratórnych podmienkach. Z výsledkov stanovených v laboratóriu č. 1 a laboratóriu č. 2 sa dá usúdiť, že kvalita referenčnej vzorky s vysokým počtom somatických buniek je postačujúca. Výsledky stanovené v laboratóriu č. 3 naznačujú určitý pokles kvality referenčnej vzorky.

Z výsledkov vyplýva, že bude nutné zvýšiť hranicu externého limitu alebo použiť vhodnejší spôsob konzervácie referenčnej vzorky.

4.3 Vyhodnotenie experimentu 3

Výsledky metód A, B, C, D, E, F sa v priemere významne líšia. Významné rozdiely existujú medzi metódami A-D, B-D, C-D, C-F, D-E, E-F. Z porovnania priemerných výsledkov vyplýva, že najnižšie hodnoty počtu somatických buniek boli stanovené metódou D, následne metódou F, potom na rovnakej úrovni metódami A a B a najvyššie hodnoty počtu somatických buniek boli stanovené na rovnakej úrovni metódami C a E. Z uvedeného vyplýva, že sa čiastočne potvrdil náš predpoklad. Výsledky stanovené

metódou D a F boli podľa predpokladu najnižšie. Nepotvrdil sa však predpoklad, že výsledky stanovené metódami A a B budú na rovnakej hladine ako výsledky stanovené metódami C a E. Výsledky stanovené metódou A a B boli o 50 000 somatických buniek . ml⁻¹ nižšie v porovnaní s výsledkami metód C a E. Výsledky stanovené metódou D boli v porovnaní s výsledkami stanovenými metódami C a E o 130 000 somatických buniek . ml⁻¹ nižšie a v porovnaní s metódami A a B o 80 000 somatických buniek . ml⁻¹ nižšie. Výsledky stanovené metódou F boli v porovnaní s výsledkami stanovenými metódami C a E o 90 000 somatických buniek . ml⁻¹ nižšie a v porovnaní s metódami A a B o 40 000 somatických buniek . ml⁻¹ nižšie.

Z výsledkov experimentu 3 vyplýva, že pri použití rôznych mikroskopických metód sa dosahujú rozdielne výsledky. Výber mikroskopickej metódy potom môže ovplyvniť správnosť nastavenia rutinných laboratórnych prístrojov typu Fossomatic a následne správnosť laboratórnych výsledkov u reálnych laboratórnych vzoriek.

5 NÁVRH NA VYUŽITIE

Získané poznatky a výsledky z riešenia problematiky v dizertačnej práci **Optimalizácia referenčnej metódy stanovenia počtu somatických buniek v surovom kravskom mlieku** boli využité a bude ich možné využiť nasledovne: poznatky zistené v experimente 1 boli využité pri optimalizácii a zavádzaní referenčnej metódy stanovenia počtu somatických buniek v surovom kravskom mlieku, jej validácii a následnej akreditácii v Národnom referenčnom laboratóriu pre mlieko a mliečne výrobky v Nitre v decembri 2004, tieto poznatky sme odporučili zohľadniť pri tvorbe medzinárodnej normy ISO/WD 13366-1 / IDF 148-1.

Zavedenie referenčnej metódy stanovenia počtu somatických buniek bolo prvým predpokladom pre realizáciu experimentu 2, v ktorom sme sa zamerali na prípravu sekundárnych referenčných materiálov s presným počtom somatických buniek. Nami pripravené sekundárne referenčné materiály sa v súčasnosti používajú v laboratóriách vykonávajúcich stanovenie počtu somatických buniek v surovom mlieku. Predovšetkým slúžia na kontrolu prístrojov typovej rady Fossomatic v Národnom referenčnom laboratóriu pre mlieko a mliečne výrobky v Nitre a v centrálnych skúšobných laboratóriách v Bratislave a v Žiline, ktoré vykonávajú skúšanie surového kravského mlieka pre trhové účely. Použitím rovnakých referenčných materiálov vo vyššie uvedených laboratóriách sa zjednotilo nastavenie laboratórnych prístrojov typu Fossomatic, odstránili sa rozdiely v laboratórnych výsledkoch, zlepšila sa presnosť a správnosť laboratórnych výsledkov. Presné a správne laboratórne výsledky sú dôležité pre prvovýrobcov mlieka ako aj spracovateľov mlieka, pretože slúžia ako podkladové informácie pre účely preplácania. Z pohľadu hygieny a technológie výroby mliečnych výrobkov je dôležité aby sa nespracovalo hygienicky nevyhovujúce mlieko s vysokým počtom somatických buniek. Správne nastavené laboratórne prístroje musia spoľahlivo detegovať počet somatických buniek v mlieku v oblasti hygienického limitu (400 000 SB . ml⁻¹) daného Nariadením (ES) č. 853/2004. Referenčné materiály pripravené v Národnom referenčnom laboratóriu pre mlieko a mliečne výrobky umožňujú nastaviť laboratórne prístroje tak, aby merali presne a správne v oblasti legislatívneho limitu.

Sekundárne referenčné materiály s presným počtom somatických buniek by mali nájsť uplatnenie aj v prevádzkových laboratóriách jednotlivých mliekarenských podnikov, kde môžu slúžiť na zvyšovanie kvality laboratórnej práce, zvyšovanie presnosti a správnosti laboratórnych výsledkov pri skúšaní vstupnej suroviny.

Z pohľadu vedy a laboratórnej diagnostiky, poznatky zistené v experimente 3 budú slúžiť pre optimalizáciu mikroskopickej referenčnej metódy stanovenia počtu somatických buniek v surovom kravskom mlieku. Na základe výsledkov experimentu sme porovnali viaceré mikroskopické metódy stanovenia počtu somatických buniek. Vo svete nebola doteraz publikovaná práca, ktorá by detailne porovnávala rozdielne mikroskopické metódy určené na stanovenie počtu somatických buniek v surovom kravskom mlieku, predovšetkým postup farbenia somatických buniek metylénovou modrou a postup farbenia etídiom bromidom. Poznatky zistené v experimente 3 sme navrhli zohľadniť pri tvorbe medzinárodnej normy ISO/WD 13366-1 / IDF 148-1.

Veľké množstvo vedeckých prác zameraných na mastitídu v chovoch dojníc, zvyšovanie účinnosti veterinárnych liečiv, genetiku a šľachtenie hovädzieho dobytku, hygienu prvovýroby mlieka, technológiu výroby mliečnych výrobkov využíva výsledky stanovenia počtu somatických buniek zistené pomocou prístrojov typu Fossomatic. Vedecký výskum preto často závisí od správneho nastavenia laboratórnych prístrojov. Optimalizácia referenčnej metódy stanovenia počtu somatických buniek a výroba kvalitných sekundárnych referenčných materiálov prispievajú k získavaniu presných údajov dôležitých pre vedecký výskum.

6 ZÁVER

Mastitída patrí medzi najdôležitejšie ochorenia hovädzieho dobytku. Ovplyvňuje ekonomiku výroby mlieka, znižuje kvalitu mlieka a jeho technologickú využiteľnosť. Hlavným indikátorom a diagnostickým štandardom pri zisťovaní mastitídy sú somatické bunky. V bežnej praxi sa na stanovenie počtu somatických buniek používajú inštrumentálne laboratórne metódy, ktorých presnosť sa musí overovať referenčnou metódou. V súčasnosti je referenčnou metódou metóda **STN EN ISO 13366-1 (2001)** Mlieko, Stanovenie počtu somatických buniek, Časť 1: Mikroskopická metóda.

V experimente 1 sme overili možnosť využitia vyššie uvedenej referenčnej metódy s použitím farbiva EtBr a metódu sme porovnali s metódou publikovanou **Vermuntom et al. (1995)**, v ktorej sa pri farbení taktiež používa farbivo EtBr.

Medzi porovnávanými metódami sme zistili štatistický rozdiel 21 000 somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$. Tento rozdiel bol podľa nášho názoru ovplyvnený metodikou výpočtu. Výsledky oboch metód sa v porovnaní s výsledkami stanovenými na prístroji Fossomatic nelíšili na hladine 300 000 somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ o viac než 5 %.

Rozšírená neistota merania vypočítaná pre metódu **EN ISO 13366-1 (2001)** je 2 %, resp. 7 % v závislosti od použitého spôsobu počítania jadier somatických buniek.

Rozšírená neistota merania vypočítaná pre metódu popísanú **Vermuntom et al. (1995)** je 8 %, resp. 10 % v závislosti od použitého spôsobu počítania jadier somatických buniek.

Z empirických poznatkov zistených počas experimentu 1 vyplýva, že uvedené metódy majú viaceré nedostatky, predovšetkým metodika počítania jadier somatických buniek a výpočet môžu výrazne ovplyvniť výsledok analýzy. Pri výpočte odporúčame

použiť vzorec uvedený v návrhu normy **ISO/WD 13366-1 IDF 148-1 (2005)**. Správnosť výsledku je vo veľmi veľkej miere ovplyvnená zručnosťou, talentom a skúsenosťami laboranta.

Uvedené metódy sme validovali a akreditovali v decembri 2004.

V nadväznosti na experiment 1 sme vykonali experiment 2, v ktorom sme sa zamerali na vývoj sekundárneho referenčného materiálu s presným počtom somatických buniek.

Pracovný postup prípravy referenčnej vzorky s nízkym počtom somatických buniek je vhodný pre prípravu sekundárnych referenčných materiálov. Pripravené referenčné vzorky boli stabilné počas celého experimentu. Hodnota reprodukovateľnosti stanovená z výsledkov meraní troch zúčastnených akreditovaných skúšobných laboratórií pri skúšaní referenčnej vzorky s nízkym počtom somatických buniek bola $\pm 10\,337$ somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$.

Pracovný postup prípravy referenčnej vzorky s vysokým počtom somatických buniek sa bude môcť použiť na výrobu referenčných vzoriek iba vtedy ak sa zvýši „externý limit“ (interval, v ktorom sa musia nachádzať výsledky stanovené laboratóriami pri skúšaní referenčnej vzorky), alebo sa zmení spôsob konzervácie referenčnej vzorky. Hodnota reprodukovateľnosti stanovená z výsledkov meraní troch zúčastnených akreditovaných skúšobných laboratórií pri skúšaní referenčnej vzorky s vysokým počtom somatických buniek bola $\pm 21\,802$ somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$.

Zistené hodnoty reprodukovateľnosti sú v porovnaní s hodnotami udávanými **Vermuntom et al. (1995)** podstatne nižšie a naznačujú zlepšenie presnosti inštrumentálnej laboratórnej metódy vplyvom jej technického vývoja za uplynulých desať rokov.

Pomocou referenčných vzoriek bude môcť Národné referenčné laboratórium pre mlieko a mliečne výrobky vykonávať kontrolu súčasného systému hodnotenia kvality surového kravského mlieka na Slovensku v oblasti somatických buniek.

Z výsledkov experimentu 2 vyplynulo viacero otázok, ktoré by mali byť predmetom ďalšieho výskumu. Predovšetkým sa bude musieť porovnať ako pôsobia rôzne koncentrácie a kombinácie konzervačných látok za aplikácie alebo bez aplikácie tepelného ošetrenia na kvalitu referenčných vzoriek.

V experimente 3 sme navzájom porovnali výsledky piatich mikroskopických metód stanovenia počtu somatických buniek a inštrumentálnej metódy. Zistili sme, že výsledky metód sa v priemere významne líšia. Výsledky stanovené v NRLM modifikovaným pracovným postupom návrhu normy ISO/WD 13366-1 IDF 148-1 za použitia farbiva EtBr a farbení pri 100 °C boli o 50 000 somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ nižšie v porovnaní s výsledkami stanovenými pri farbení metylénovou modrou podľa normy ISO/WD 13366-1 IDF 148-1. Rozdiel medzi metódami bol však ovplyvnený výsledkami vzorky č. 10 stanovenými v NRLM a odľahlými výsledkami stanovenými v kolaboratívnej štúdií pri farbení metylénovou modrou. Výsledky stanovené pracovným postupom návrhu normy ISO/WD 13366-1 IDF 148-1 za použitia farbiva EtBr a farbení pri 50 °C boli o 130 000 somatických buniek $\cdot \text{ml}^{-1}$ nižšie v porovnaní s výsledkami stanovenými pri farbení metylénovou modrou podľa normy ISO/WD 13366-1 IDF 148-1.

Odporúčame vykonať zmenu v návrhu normy ISO/WD 13366-1 IDF 148-1 a pri metóde farbenia pomocou EtBr navrhujeme použiť teplotu 100 °C. Neodporúčame ďalej používať spôsob výpočtu podľa STN EN ISO 13366-1 (2001) s použitím faktora závislého od počtu kompletne zrátaných pruhov, pretože môže dochádzať k skresleniu výsledkov. Ako vhodnú alternatívu odporúčame použiť nový spôsob výpočtu, ktorý sa uvádza v návrhu normy ISO/WD 13366-1 / IDF 148-1.

Správnosť laboratórných výsledkov stanovenia počtu somatických buniek má význam z pohľadu laboratórnej diagnostiky, hygieny prvovýroby mlieka, technológie výroby mliečnych výrobkov a bezpečnosti potravín. Veríme, že prostredníctvom zistených výsledkov a poznatkov sme prispeli k optimalizácii referenčnej mikroskopickkej metódy stanovenia počtu somatických buniek v surovom kravskom mlieku.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. **BURDOVÁ, O. – BARANOVÁ, M. – MAĽA, P. – PAŽÁKOVÁ, J.** Mastitidy I. Aktuálny problém prvovýroby mlieka. In *Infonet*, roč. 6, 1999, s. 27 - 28.
2. **DRAHOŠOVÁ, K. – DRONČOVSKÝ, M.** Mastitída – najčastejšia príčina zníženej akosti mlieka. In *Mliekarstvo*, roč. 35, december 2004, č. 4, s. 7.
3. **Eurachem:** Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement – Guide. 8. Step 4. Calculating the Combined Uncertainty. [online]. 2000 [cit. 2006-02-19]. Dostupné na internete: <www.measurementuncertainty.org/mu/guide/index.html>.
4. **GERALD, M. J. J.** How Does Somatic Cell Count Affect Milk Quality & Safety? [online]. 2001 [cit. 2005-12-29]. College of Agriculture and Life Sciences, Department of Dairy Science. Dostupné na internete: <www.dasc.vt.edu/faculty/jones/MilkSafe.htm>.
5. **GRIEGER, C. – HOLEC, J. et al.** 1990. *Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov*. 1. vyd. Bratislava : Príroda, 1990. 397 s. ISBN 80-07-00253-7.
6. **GRÖHN, Y. T. – WILSON, D. J. – GONZÁLEZ, R. N. – HERTL, J. A. – SCHULTE, H. – BENNETT, G. – SCHUKKEN, Y. H.** Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. In *Journal Dairy Science*, roč. 87, 2004, s. 3358 - 3374.
7. **HALAJ, M.** *Chyby a neistoty merania – neistoty merania - Všeobecná metrologia: Prednáška*. Strojnícka fakulta STU v Bratislave, november 2004. s. 3, s.17, s.19 a s. 20. [online]. 2004 [cit. 2006-06-18]. Strojnícka fakulta STU v Bratislave. Dostupné na internete: <<http://www.kam.sjf.stuba.sk/katedra/vyuka/pt4/VM-prednaska6-neistota.pdf>>.
8. **HARMON, R. J.** Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. In *Journal Dairy Science*, roč. 77, 1994, č. 7, s. 2103 – 2112.
9. **ICAR:** Analytical methods for milk recording analysis. [online]. Version n°1 – 13/10/2005 [cit. 2005-12-30]. International Committee for Animal Recording. Dostupné na internete: <http://www.icar.org/DOCS/milk_laboratories_leray/List_analytical_methods_in_milk_recording.pdf>.
10. **ISO/WD 13366-1 / IDF 148-1:** 2005, *Milk - Enumeration of somatic cells - Part 1: Microscopic method (Reference method)*.

11. **ISO 13366-3:** 1997, *Milk - Enumeration of somatic cells - Part 3: Fluoro-optoelectronic method.*
12. **KAZDA, J.** Úvod do nejistôt merení. In *Stanovovanie neistôt merania, kalibrácie a výkonu skúšok : zborník prednášok zo seminára.* Spišská Nová Ves, Kalibračné združenie SR a Q-Test plus s.r.o. Bratislava, február 2006, s. 70 a s. 73.
13. **KOLLER, L.** Analytická chémia. Princípy analytických metód pre anorganickú prvkovú analýzu: Študijný materiál pre študentov HF a FBERG TU. Košice: Technická univerzita v Košiciach, 2002 s. 16. [online]. 2002 [cit. 2006-01-19]. Technická univerzita Košice. Dostupné na internete: <http://sk.ripta.lib.tuke.sk/16000/pdf/AnalytickaChemiaLadislavKoller_ALL.pdf>.
14. **KOVÁČ, G. - et al.** *Choroby hovädzieho dobytku.* 1. vyd. Prešov : M&M vydavateľstvo Prešov, október 2001. s. 673.- 676. ISBN 80-88950-14-7.
15. **KOVÁČIK, J. – VALENT, M. – KOLLÁROVÁ, E.** *Fyziológia zvierat.* 2. upravené vyd. Nitra : Vydavateľské a edičné stredisko Vysokej školy poľnohospodárskej v Nitre, 1996. 284 s. ISBN 80-7137-322-2.
16. **EALÍK, V.** Neistoty merania pri kalibrácii posuvných meradiel. In *Stanovovanie neistôt merania, kalibrácie a výkonu skúšok : zborník prednášok zo seminára.* Spišská Nová Ves : Kalibračné združenie SR a Q-Test plus s.r.o. Bratislava, február 2006, s. 103.
17. *Nariadenie (ES) č. 853/2004 Európskeho parlamentu a Rady z 29. apríla 2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu.* [online]. 2004 [cit. 2006-02-07]. Štátna veterinárna a potravinová správa SR. Dostupné na internete: <http://www.svps.sk/sk/pdf/legislativa/nk_0853_2004.pdf>.
18. **PYÖRÄRLÄ, S.** Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. In *Vet. Res.* roč. 34, 2003, 565 - 578.
19. **RIMARČÍK, M.** Opisné charakteristiky. [online]. [cit. 2006-02-19]. Marián Rimarčík, osobná web stránka. Dostupné na internete: <<http://rimarcik.com/sk/navigator/och.htm>>.
20. **RUEGG, P. L. – TABONE, T. J.** The Relationship Between Antibiotic Residue Violations and Somatic Cell Counts in Wisconsin Dairy Herds. In *Journal Dairy Science*, roč. 83, 2000, s. 2805 – 2809.
21. *Smernica rady 92/46/EHS zo 16. júna 1992, ktorou sa stanovujú hygienické predpisy pre výrobu surového mlieka, tepelne ošetrovaného mlieka a mliečnych výrobkov a ich uvádzanie na trh.* Official Journal of the European Communities No. L 268, 14-9-1992.
22. **SMITH, K. L.** Standards for somatic cells in milk: Physiological and regulatory. Mastitis Newsletter, Newsletters of the IDF No.144, 1996. s 7.
23. **SNAS: Slovenský národný akreditačný systém:** Metodické smernice na akreditáciu. Vyjadrovanie neistôt merania pri kalibrácii, MSA 0104-97 EAL R2. [online]. 1997 [cit. 2006-01-19]. ÚNMS SR. Dostupné na internete: <http://www.snas.sk/files/msa/MSA_0104_december1997.pdf>.
24. **STN EN ISO 707:** 2001, *Mlieko a mliečne výrobky. Návod na odber vzoriek.*
25. **STN EN ISO 13366-1:** 2001, *Mlieko, Stanovenie počtu somatických buniek, Časť 1: Mikroskopická metóda.*

26. **STN EN ISO 13366-3:** 2001, *Mlieko, Stanovenie počtu somatických buniek, Časť 3: Fluorescenčná optická elektronická metóda.*
27. **URBAN, P.** Zdroje neistôt pri kalibrácii strmeňových mikrometrov. In *Zborník prednášok zo seminára Stanovovanie neistôt merania, kalibrácie a výkonu skúšok.* Spišská Nová Ves : Kalibračné združenie SR a Q-Test plus s.r.o. Bratislava, február 2006, s. 111.
28. **VERMUNT, A.E.M. – LOEFFEN, G.J.M – VAN DER VOET, H. – NABER, M.A.A.M.:** Development of reference samples for the calibration and quality control of somatic cell count using a Fossomatic instrument. In *Netherlands Milk & Dairy Journal.* roč. 49, 1995, s. 000 - 000.
29. **ZAJÁC, P. – GOLIAN, J. – NOVÁKOVÁ, R.** Vplyv Zvýšeného počtu somatických buniek na zdravotnú neškodnosť surového kravského mlieka. In *Bezpečnosť a kontrola potravín : zborník z medzinárodnej vedeckej konferencie.* Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 6. -7. apríl 2005, s. 151–155, ISBN 80-8069-503-2.

8 PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU

Odborné publikácie

- **ZAJÁC, P. - GOLIAN, J. - VÁCZIOVÁ, Z.,** 2006. Výsledky vyšetrenia surového kravského mlieka na RIL v SR za roky 2001 – 2005. In *Bezpečnosť a kontrola potravín II. diel : zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie.* Nitra : Slovenská poľnohospodárska a potravinárska komora, 5. – 6. apríl 2006, s. 299-305, ISBN 80-8069-682-9.
- **ZAJÁC, P. - GOLIAN, J.,** 2006. Stanovenie somatických buniek v surovom kravskom mlieku. In *Bezpečnosť a kontrola potravín II. diel : zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie.* Nitra : Slovenská poľnohospodárska a potravinárska komora, 5. – 6. apríl 2006, s. 291-298, ISBN 80-8069-682-9.
- **GOLIAN, J. - ZAJÁC, P.,** 2006. Porovnanie účinnosti vybraných metód stanovenia somatických buniek v surovom kravskom mlieku. In *Drúbež a mléko ve výživě člověka : zborník z konferencie s medzinárodnou účasťou.* Praha : IC BP, MZe ČR – Úřad pro potraviny, 24.5.2006, s.77-83, ISBN 80-213-1548-2.
- **GOLIAN, J. - ZAJÁC, P., Vácziová, Z.,** 2006. System of self Control in Dairy Factory. In *Proceeding Book (Abstarct) of 6-th Internatioanl Scientific Conference Risk Factors of Food Chain.* Nitra, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, October 12-th, 2006, p.13, ISBN 80-8069-759-0.
- **GOLIAN, J. - ZAJÁC, P., VÁCZIOVÁ, Z.,** 2006, Systémy vlastnej kontroly v mliekárenskom priemysle. In *Rizikové faktory potravného reťazca : zborník z konferencie.* Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 12.10.2006, s. 96- 99, ISBN 80-8069-760-4.
- **ZAJÁC, P. - GOLIAN, J., NOVÁKOVÁ, R.:** Vplyv Zvýšeného počtu somatických buniek na zdravotnú neškodnosť surového kravského mlieka. In *Bezpečnosť a kontrola potravín : zborník z medzinárodnej vedeckej konferencie.* Nitra :

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 6. –7. apríl 2005, s. 151–155, ISBN 80-8069-503-2.

- ČAMBALOVÁ, M., SOKOL, J., GOLIAN, J., BOHUNICKÁ, T., **ZAJÁC, P.**: Odber vzoriek surového kravského mlieka klasickou metódou a autosamplerom (*Sampling of Raw Cow Milk by a Contentional Method and Autosampler*). In *Aktuálne otázky výroby a spracovania mlieka - bezpečné potraviny pre všetkých : zborník prednášok a posterov*, 27.-28. mája 2004, Štrbské Pleso - Vysoké Tatry. - Bratislava : Štátna veterinárna a potravinová správa SR, 2004. s. 126-130, 80-88985-99-4.
- **ZAJÁC, P.**, GOLIAN, J., SOKOL, J.: Výsledky vyšetrenia surového kravského mlieka na RIL v Slovenskej republike za roky 2001, 2002 a 2003 (Result of Monitoring of RIL in Raw Cow Milk in Slovakia Performed by Central Laboratory in the years 2001, 2002 and 2003). In *Aktuálne otázky výroby a spracovania mlieka - bezpečné potraviny pre všetkých : zborník prednášok a posterov*, 27.-28. mája 2004, Štrbské Pleso - Vysoké Tatry. - Bratislava : Štátna veterinárna a potravinová správa SR, 2004. s. 228-232, 80-88985-99-4.
- GOLIAN, J., SOKOL, J., **ZAJAC, P.**, LORINČÁK, L., BOHUNICKÁ T.: Mykotoxíny v krmivách a ich osud v organizme zvierat. Časť I.- Účinky a eliminácia mykotoxínov. In *V. Kábrtovy dietetické dny : zborník z konferencie*. Brno : Veterinárni a farmaceutická univerzita Brno, 23. január 2003, s. 29 – 36, 80–7305–414–0.
- GOLIAN, J., SOKOL, J., **ZAJAC, P.**, BOHUNICKÁ, T., LORINČÁK, L.: Analytické spektrálne metódy používané v potravinárskej a veterinárnej praxi. In *Laboralim 2003 : zborník prednášok z XIV medzinárodnej konferencie o analytických metódach*. Banská Bystrica : Slovenská technická univerzita, 18.-19. február 2003, s.175 – 179, ISBN 80- 1887- 4.
- GOLIAN, J., SOKOL, J., **ZAJÁC, P.**: Vývoj a perspektívy chromatografických metód. In *Chromatografické metódy a zdravie človeka : zborník abstraktov z medzinárodnej konferencie*. Piešťany, SCHS SAV, 10.–13. 11. 2003, s. 48 – 49, ISSN 1335-5236.
- GOLIAN, J., SOKOL, J., **ZAJÁC, P.**: Detekcia penicilínov chromatografickými metódami. In *Chromatografické metódy a zdravie človeka : zborník abstraktov z medzinárodnej konferencie*. Piešťany, SCHS SAV, 10.–13. 11. 2003, s. 50, ISSN 1335-5236.

Účasť na seminároch a konferenciách

- **ZAJÁC, P.:** Uvedenie Nariadení (ES) č. 852, 853, 854 / 2004 do praxe v prvovýrobe a u spracovateľov mlieka. Prednáška – Seminár: In *Kvalita surového mlieka 2006, Teplota tuhnutia mlieka : zborník prednášok zo semináru*. Žilina : Výskumný ústav mliekárenský, a.s. Žilina; Slovenský zväz prvovýrobcov mlieka; Slovenský mliekárenský zväz, 2. marec 2006, s.19 -24, ISBN 80-969312-2-9.
- **ZAJÁC, P.:** Aktuálne úlohy NRLM pri hodnotení kvality surového mlieka. Prednáška – Seminár: In *Kvalita surového mlieka 2006, Teplota tuhnutia mlieka : zborník prednášok zo semináru*. Žilina : Výskumný ústav mliekárenský, a.s. Žilina; Slovenský zväz prvovýrobcov mlieka; Slovenský mliekárenský zväz, 2. marec 2006, s.25 -29, ISBN 80-969312-2-9.
- **ZAJÁC, P.:** Činnosť a zameranie Národného referenčného laboratória pre mlieko a mliečne výrobky. Prednáška – Odborný seminár: In *Súčasný stav vo výrobe a hodnotení mlieka na Slovensku*. Ministerstvo pôdohospodárstva SR, Odbor živočíšnych komodít, Bratislava; Milex Progres a.s., Bratislava – Centrálné skúšobné laboratórium, 29. 9. 2005.
- **ZAJÁC, P.:** Zavádzanie a využitie referenčnej metódy pre detekciu somatických buniek v surovom kravskom mlieku. Prednáška: In *III. vedecká konferencia študentov a doktorandov : zborník abstraktov*, Nitra, 14. apríl 2005. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. s. 87, ISBN 80-8069-506-7.
- **ZAJÁC, P.:** Vplyv zvýšeného počtu somatických buniek na zdravotnú neškodnosť surového kravského mlieka. Prednáška: In *Bezpečnosť a kontrola potravín : zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie*, 6.-7. apríla 2005. - Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. s. 151-155, ISBN 80-8069-503-2.
- **ZAJÁC, P.:** National Reference Laboratory for Milk and Milk Products. Lecture In *TAIEX Workshop on „Inter-laboratory testing with regard to hygiene of milk and milk products“ AGRO3087/7881*. Maisons-Alfort, Paris, France, 1 : EU Community Reference Laboratory For Milk & Milk Products; French Agency for Food Safety, 3.-14. october 2003.