



REKALKULACE PŘEPOČTOVÉ ROVNICE BAKTERIÁLNÍCH ELEKTRONICKÝCH IMPULSŮ NA CELKOVÝ POČET MIKROORGANISMŮ V KONTROLE KVALITY MLÉKA V ČESKÉ REPUBLICE

Oto Hanuš¹, Radoslava Jedelská¹, Pavel Kopunec², Zdeňka Klímová², Romana Tučková², Jan Zlatníček², Miloš Klimeš², Marcela Klimešová¹, Petr Roubal¹

¹ Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6

² Českomoravská společnost chovatelů, Laboratoře rozborů mléka Brno-Tuřany a Buštěhrad, Benešovská 123, 252 09 Hradištko

Recalculation of transformation equation for bacterial electronic impulses to total count of microorganisms in milk quality control in the Czech Republic

Abstrakt

Vývoj hygienických režimů dojení a mastitidní léčby krav může změnit druhové spektrum celkového počtu mikroorganismů (CPM). To může interferovat do vztahu mezi referenční a rutinní metodou stanovení CPM při kontrole kvality mléka. Cílem bylo přepočíst kalibrační rovnici transformace z bakteriálních elektronických impulsů (BEI) průtočné cytometrie (IBC, Bentley) na výsledky referenční metody stanovení CPM. Tato validace je významná pro výběr nejvhodnější varianty rovnice podle výsledků referenční kultivační metody (n = 1 651 párů referenčních a rutinních měření CPM). Data CPM a BEI byla použita v původních a logaritmičtě transformovaných hodnotách. Databáze byla korigována uříznutím dat a testy odlehlosti. Provedeny byly základní statistické metody a lineární

regrese. Byla vypočtena sada relevantních konverzních rovnic podle praktických laboratorních prostředových podmínek. Korelační koeficienty ($P < 0,001$) mezi metodami byly: 0,872 pro všechny hodnoty původní; 0,911 pro hodnoty logaritmičtě transformované. Uříznutím (≤ 1000 a ≤ 500 tis.CFU/ml) dat klesla logicky těsnost těchto závislostí a byly redukovány směrodatné odchylky průměrného rozdílu (sdD): z 350 (360 a 352) na 70 až 100 (98 až 104 a 73 až 77) tis.CFU/ml pro ≤ 1000 a ≤ 500 tis.CFU/ml. Testy odlehlosti redukovaly sdD na 28 až 36 tis.CFU/ml. Hlavní model lineární rovnice pro modifikaci přístrojové transformační rovnice byl: $\log \text{BEI} \times \log \text{CPM}$ referenčně $y = 1,0302x - 3,6565$ ($r = 0,859$; $P \leq 0,001$). Nové transformační rovnice jsou součástí softwarového portfolia systému kontroly hygienické a zdravotní kvality mléka.

Klíčová slova: kvalita syrového mléka, celkový počet mikroorganismů, referenční kultivační metoda, rutinní přístrojová metoda, průtočná cytometrie

Abstract

The development of milking hygiene regimes and mastitis therapy in dairy cows can change species spectrum of total count of microorganisms (TCM). This can interfere into relationship between reference and routine methods of TCM determination in milk quality control. The aim was to recalculate the transformation calibration equation from bacterial electronic impulses (BEI) of flow cytometry (IBC, Bentley) on reference method results of TCM determination. This validation is important for choice of most suitable variant of equation according to reference cultivation method results (n = 1 651 pairs of reference and routine TCM measurements). The TCM and BEI data were used in original values and also as logarithmically transformed. Database was corrected by data cutting and outlier tests. Basic statistic procedures and regression analysis were performed. The set of relevant conversion equations was calculated according to practice environmental conditions. The correlations coefficients ($P < 0.001$) between methods were: 0.872 for all original values; 0.911 for log transformed values. Data cutting (≤ 1000 and ≤ 500 10^3 CFU/ml) logically reduced tightness of these dependencies and standard deviations (sdD) of mean differences

as well: from 350 (360 and 352) to 70 up 100 (98 up 104 and 73 up 77) 10^3 CFU/ml for ≤ 1000 and ≤ 500 10^3 CFU/ml. Outlier tests reduced sdD to 28 up 36 10^3 CFU/ml. The main model of linear equation for modification of instrumental transformation equation was: $\log \text{BEI} \times \log \text{TCM}$ reference $y = 1.0302x - 3.6565$ ($r = 0.859$; $P \leq 0.001$). The new transformation equations are part of software portfolio of hygienic and health milk quality control.

Keywords: raw milk quality, total count of microorganisms, reference cultivation method, routine instrumental method, flow cytometry

Úvod

Jakost syrového mléka je důležitým, ne-li nejvýznamnějším, faktorem kvality následných mléčných výrobků. Musí být pravidelně kontrolována, protože mléko, pro svůj vysoký obsah vody a živin, je ideálním prostředím pro rozvoj mikroorganismů, a tudíž od momentu nadojení je materiálem, který je vysoce ohrožen kažením. Otázka jeho uložení a transportu je proto citlivým technologickým procesem. Kvalita mléka ovlivňuje trvanlivost mléčných výrobků. Dobrá jakost syrového mléka vytváří a zajišťuje provozní jistotu pro farmáře (dobrá farmářská cena), pro zpracovatele mléka (prodejnost a trvanlivost mléčných výrobků) a podmiňuje bezpečnost potravinového řetězce s ohledem na konzumenty.

Celkový počet mezofilních mikroorganismů (CPM) je hlavním hygienickým ukazatelem kvality syrového mléka. V případě EU je určeno, že standardní syrové kravské mléko může obsahovat (při 30 °C kultivace) $\leq 100 \times 10^3$ KTJ \times ml $^{-1}$. V praxi se CPM obvykle stanovuje kultivačními mikrobiologickými metodami nebo jako CPM včetně mrtvých bakterií na zařízení průtočné cytometru.

Výchozí norma je ČSN EN ISO 4833-1 Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Vzorek nebo jeho ředění se pečlivě promíchá pipetou (opakovaným nasáváním) nebo 25násobným převrácením vzorkovnice nebo zkumavky. Očkuje se sterilní pipetou po 1 ml zkoušeného vzorku nebo jeho ředění vždy po dvou sériích Petriho misek. Inokulum se nejpozději do 15 min od promíchání zalévá cca 12 až 15 ml agarem s kvasničným extraktem (GTK, Milcom), který je předem vychlazený na 45 °C ve vodní lázni, a po utužení média jsou misky inkubovány dnem vzhůru při 30 °C po dobu 72 ± 3 h. Po kultivaci jsou hodnoceny misky, které obsahují počet kolonií 10 - 300 v 1 ml.

Dalším způsobem je nepřímé stanovení CPM metodou průtočné cytometrie. Ta mívá často automatickou formu v provedení různých výrobců (IBC a Bactocount, Bentley Instruments; Bactoscan, Foss Electric; atd.). Fluoro-optoelektronická metoda průtočné cytometrie (FC) pro stanovení CPM musí být kalibrována na velkých souborech výsledků referenční kultivační plotnové metody. Nejdříve se specifickou enzymatickou hydrolýzou a centrifugací

v gradientu (mechanicky) odstraní ze vzorku tukové kuličky a somatické buňky, aby nevytvářely interferenční efekty. Bakteriální buňka je za podmínek metody obarvena barvivem (nejčastěji akridinoranž). Buňka po osvětlení emituje specifické záření, které je osciloskopicky registrováno jako elektronický impuls, tedy mikrob. Proud vzorku teče v laminárním proudu pufrovacích roztoků pod fluoro-optickým mikroskopem. Výsledky bakteriálních elektronických impulsů (BEI) se přepočítávají faktory nebo rovnicemi na výsledky kultivačních metod, tedy na počet mikroorganismů (kolonie formujících (tvořících) jednotek, KTJ) v 1 ml mléka. Pro syrové mléko bývají třeba specifické kalibrace na různé biologické druhy mléka (TOMÁŠKA et al., 2006). Dříve se, se stejným principem, využívala i metoda stanovení CPM v nekonečném pásu vzorkového filmu na rotujícím disku.

V principu tedy tyto metody nepřímého stanovení CPM musejí být kalibrovány přepočtovou rovnicí na hodnoty výše popsané metody referenční, tedy kultivační (plotnové), i když jsou známy rovněž systémy mikrobiologického hodnocení kvality syrového mléka podle kvantity elektronických impulsů vzorku (bez kalibrace na přímou metodu), kde je kontrolován jejich počet na zvláštních vzorcích a rovněž opakovatelnost stanovení počtu BEI. Otázkami kalibrace, přepočtu a sjednocení výsledků CPM z metod přímých na nepřímé se zabývala řada autorů: SUHREN a WALTE, 1998, 2001; ČSN EN ISO 4833-1, 1999; SUHREN a REICHMUTH, 2000; SUHREN et al., 2000, 2001; NINANE et al., 2000; BOLZONI et al., 2000, 2001; TOMÁŠKA et al., 2006.

Vývoj hygienických režimů dojení a mastitidní léčby krav může změnit druhové spektrum celkového počtu mikroorganismů (CPM). To může interferovat do vztahu mezi referenční a rutinní metodou stanovení CPM při kontrole kvality mléka. Cílem bylo přepočíst kalibrační rovnici transformace z bakteriálních elektronických impulsů (BEI) průtočné cytometrie na výsledky referenční metody stanovení CPM.

Materiál a metody

Byl vytvořen soubor (2015) přístrojových (nepřímá rutinní metoda; IBC FC (flow cytometry) Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA) a referenčních dat (RE, kultivační metoda podle ČSN EN ISO 4833-1 a EN ISO 4833, klasika) o zastoupení celkového počtu mezofilních mikroorganismů (CPM v CFU (colony forming unit) v 1 ml mléka) v syrovém kravském mléce v laboratořích kontroly kvality mléka (ČMSCH, LRM Brno-Tuřany a LRM Buštěhrad). Metoda IBC je již dva roky považována za nepřímou, ale ekvivalentní referenční metodě ve smyslu EN-ISO 4833-1: 2013 a EN-ISO 4833-2: 2013. Při stanovení CPM bylo postupováno podle relevantních standardních operačních postupů (SOP, včetně původní transformační rovnice) akreditovaných laboratoří, manuálu výrobce (IBC Bentley) a příslušné normy (STN 57 0539; EN ISO 16140). Referenčně byl stanoven CPM podle ČSN EN ISO 4833-1.

Soubor zahrnoval celkem 1 651 výsledků párových vyšetření CPM na identických vzorcích syrového kravského mléka oběma metodami (CPM pro IBC a RE - kultivačně (klasika)). Byl zpracován ve 2 laboratořích na 4 přístrojích IBC. V laboratořích vzniklo 848 a 803 kompletních párových vzorkových vyšetření CPM a po přístrojích se pohyboval počet párových vyšetření od 282, přes 285 a 518, do 566. Podle uvedených kritérií byl pak soubor dat rozdělen a sumárně a odděleně zpracováván. Kalendářní měsíce byly, jako třídící faktor a jako metodické kritérium pro věrohodnost výsledků mikrobiologických analytických metod, z logických důvodů, zamítnuty (předpoklad, že konzistentní analytická metoda nevykazuje závislost věrohodnosti výsledků na jakémkoliv sezóně).

Statistické vyhodnocení bylo provedeno (MS Excel, Microsoft, Redmond, USA) metodami vyčíslení základních statistických parametrů mléčných ukazatelů (n = počet případů, \bar{x} = průměr aritmetický, \bar{x}_g = průměr geometrický, s_x = směrodatná odchylka, v_x = variační koeficient (%), \min = minimum, \max = maximum, m = medián, t = hodnota testovacího kritéria párového t -testu) a metodou lineární regrese (koeficient determinace (R^2) a koeficient korelace (r)).

Poněvadž u výsledků CPM a počtu somatických buněk nelze očekávat normální frekvenční distribuci dat (ALI a SHOOK, 1980; SHOOK, 1982; RENEAU, 1986; HANUŠ et al., 2007, 2009, 2011; JANŮ et al., 2007), byla příslušná data logaritmicke transformována (\log_{10}). Uvedené vedlo i k vyčíslení geometrických průměrů. Ze stejných důvodů bylo také provedeno ošetření datových souborů testy odlehlosti a uříznutím dat. Uříznutí dat bylo, ve vazbě na normy kvality mléka a analytické mikrobiologické požadavky, provedeno empiricky na hodnotách $CPM \leq 1\ 000$ a $500 \cdot 10^3$ CFU.ml⁻¹ (tis. CFU v 1 ml mléka, tis.CFU/ml). Ze stejných důvodů byl použit Grubbsův test odlehlosti výsledků (na konvenční hladině pravděpodobnosti 95 % konfidenčního intervalu). Zatímco uříznutí dat bylo aplikováno k redukci n a sjednocení s legislativou u souborů na hodnoty kultivačních referenčních výsledků CPM, test odlehlosti byl zaměřen na distribuce souborů dat pro rozdíly mezi hodnotami metod na párových vzorcích.

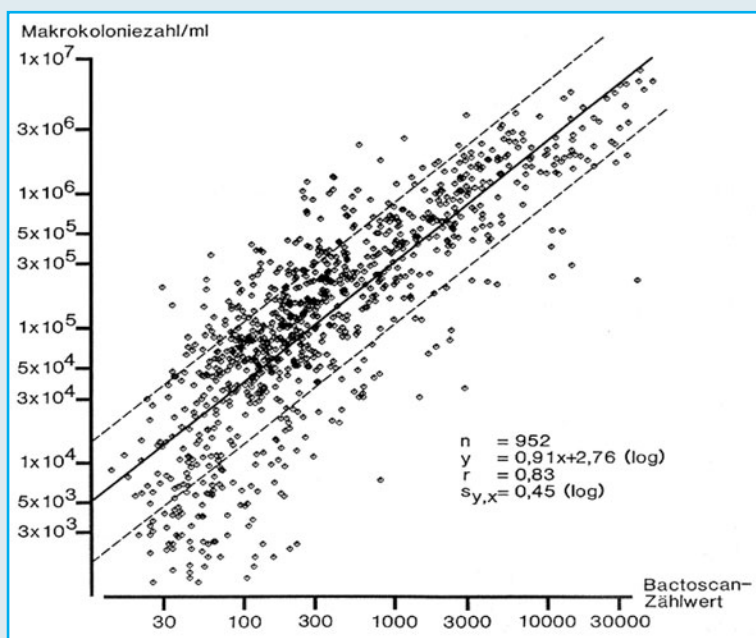
Výsledky a diskuse

Hodnocení za celý soubor umožňovalo výběr jedné transformační rovnice. Méně vhodnou variantou by byly přístrojově specifické rovnice. Bylo provedeno hodnocení celkem bez selekce a s omezením dat uříznutím (≤ 1000 a ≤ 500 tis.CFU/ml; vše A) stejně jako s vyloučením odlehlych hodnot příliš velkých rozdílů jak v původních (B) tak absolutních hodnotách (C). Ve většině hodnocení A, B a C jsou rozdíly mezi aritmetickými a geometrickými průměry CPM obou metod (IBC FC a RE) celkem podobné, jen u celkového hodnocení A je rozdíl geometrických průměrů CPM výrazněji nižší. Všechny rozdíly mezi aritmetickými průměry pro všechny způsoby ošetření dat jsou však statisticky významné ($P < 0,01$ a $P < 0,001$). V celkovém

hodnocení A existuje výrazně vyšší variabilita dat CPM než v souborech redukováných A, B a C, převážně o 100 % a více, v důsledku vysokých maximálních hodnot (IBC 4 268 a RE 7 550 tis.CFU/ml). Maxima v redukováných souborech jsou výrazně nižší (3 020 tis.CFU/ml). S ohledem na tuto skutečnost a na hygienický standardní limit CPM 100 tis.CFU/ml (maximum pro standardní mléko), se jeví redukované soubory A (≤ 1000 a ≤ 500 tis.CFU/ml), B a C jako logicky vhodnější k následnému příslušnému výběru souborů pro finální derivace transformačních predikčních rovnic. Je celkově naznačeno, že přijetí redukováných souborů pro odvození nové transformační predikční rovnice povede ke snížení CPM stanovených na IBC CF průměrně o 10 až 15 tis.CFU/ml. Tento jev může být výsledkem starší předchozí rovnice, kdy za dobu její aplikace (cca 10 roků) mohlo dojít k posunu v druhové skladbě CPM v terénu (chovech dojníc).

Celkové regresní vztahy naznačily významné korelace ($P < 0,001$) mezi hodnotami metod (RE a IBC FC) pro všechna ošetření souborů. Pro celkový soubor A je to 0,872 pro hodnoty původní a 0,911 pro hodnoty logaritmicke transformované ($P < 0,001$). Uříznutím (A, ≤ 1000 a ≤ 500 tis.CFU/ml) dat souborů klesla logicky těsnost těchto závislostí pro hodnoty původní i logaritmované, nicméně všechny vztahy jsou stále významné ($P < 0,001$). Je důležité, že se, oproti celkovému hodnocení, uříznutím dat výrazně redukuje hodnota směrodatných odchylek průměrné diferece z hodnot kolem 350 (360 a 352) tis.CFU/ml na 70 až 100 (98 až 104 a 73 až 77) tis.CFU/ml pro A ≤ 1000 a ≤ 500 tis.CFU/ml. Naopak očištěním souborů dat (B a C) o odlehle hodnoty rozdílů logicky těsnost této závislosti roste. Souběžná relevantní redukce hodnot směrodatných odchylek průměrné diferece u ošetření B a C na hodnoty 28 až 36 tis.CFU/ml je sice zajímavá, ale principiálně umožněna právě způsobem statistického ošetření.

Jak vyplývá z výsledků prací REICHMUTH et al. (1988) a SUHREN et al. (1988), existuje i v mlékařské mikrobiologické analytice vliv vis maior. Jedná se o občasný výskyt specifických vzorků mléka, kterému nelze zabránit a které jsou zdrojem výrazných metodických rozdílů mezi CPM derivovaným z BEI a CPM stanoveným klasicky. Na Obr. 1 je patrný soubor výsledků BEI a CPM použitý k derivaci transformační predikční rovnice u zařízení Bactoscan III. Zařazeny byly zřejmě všechny dosažené hodnoty, neboť jsou zřetelné i značné výsledkové disproporce mezi výsledky srovnávaných metod. Jak lze snadno odečíst jeden příklad za všechny, který ovšem není z kategorie těch nejvýraznějších: - ve vodorovné linii od hodnoty 50 tis.CFU/ml pro CPM (osa y, průměrné mléko) se vyskytuje celá řada instrumentálních položek s různou hodnotou BEI; - podle příslušné transformační rovnice bude této hodnotě příslušet hodnota cca 150 BEI; - tedy hodnotě cca 150 BEI bude transformací přiřazeno 50 tis.CFU/ml; - ve svislé přímce na úrovni 150 BEI ovšem leží škála výsledků CPM kultivačně od cca 2 tis.CFU/ml do 370 tis.CFU/ml; - všem těmto hodnotám CPM kultivačně (2 až 370 tis. CFU/ml) bude přiřazena hodnota 50 tis.CFU/ml CPM



Obr. 1 Bactoscan III: Vztah mezi výsledky Bactoscanové hodnoty (nápočtu, BEI) a určením počtu bakteriálních makrokolií v syrovém mléce (podle SUHREN et al., 1988).

Fig. 1 Bactoscan III: Relationship between results of Bactoscan value (BEI count) and determination of bacterial macrocolony count in raw milk (according to SUHREN et al., 1988).

instrumentálně; - v maximech jsou patrné velké rozdíly, kde difference 50 tis.CFU/ml je relativně poměrně malým číslem; - v celém souboru (Obr. 1) lze rozkrýt řadu takovýchto diferencí. Přesto, z nějakého důvodu, zůstaly tyto zjevné rozdíly v datovém souboru pro transformační rovnici zachovány. Autoři je tedy považovali za reálné z důvodu ověření správnosti měření obou metod pro CPM v daných konkrétních případech. Je rovněž známo, že akreditované mléčné laboratoře vykazují nejistoty výsledků měření CPM podle metod instrumentálních a kulturačních běžně od ± 15 do ± 30 až ± 35 % nad průměrnými hodnotami větších souborů. Opakovatelnost klasické mikrobiologické analytické metody pro CPM je pak běžně ± 20 %, proto výše uvedené zase tolik nepřekvapuje. Ve smyslu zmíněného je pak striktně nezbytné provádět srovnání výsledků CPM laboratoří a metod při jakýchkoliv komerčních sporech o kvalitu syrového mléka. Některé země proto přistoupily ke kontrole kvality syrového mléka přímo podle kvantity elektronických impulsů (BEI) vzorku, tedy bez kalibrace instrumentální metody na přímou kulturační (referenční) metodu pomocí transformační rovnice CPM. Pro kontrolu BEI zde pak byly vyvinuty pro přístroje i specifické mléčné standardy. Tyto metodické excesy se samozřejmě vyskytnou i při přijetí nové transformační rovnice pro IBC a tuto skutečnost je nutné brát jako fakt a vyhnout se její praktické dramatizaci, nějakým náhradním metodickým opatřením, jako třeba opakováním vzorků a konsensuálním nahrazením těchto nečetných (výjimečných) výsledků hodnotami kulturační metody (RE). Tento problém je zřejmě zapříčiněn historickou, i lokálně specifickou dynamikou ve vývoji složení CPM, co do zastoupení

bakteriálních druhů s různými nároky na kulturační teploty, v důsledku specifických hygienických režimů dojení, případně léčby krav, kteréžto efekty interferují negativně do jinak většinou poměrně těsného a pozitivního vztahu použitých metod stanovení CPM. V tomto smyslu lze proto oprávněně uvažovat, že zmíněnou časovou změnou zastoupení bakteriálních druhů v CPM a celkové mikroflóry mléka, z naznačených důvodů druhů s rozdílnou afinitou ke kulturační teplotě, v jistém smyslu driftují časem i bazální hodnoty referenčních metod, kdy kulturační metoda může poskytnout stejný výsledek CPM při rozdílném zastoupení celkové mikroflóry mléka a naopak. Je tedy tímto i v mlékařské mikrobiologii potvrzeno Archimédovské rčení, že neexistuje pevného bodu ve vesmíru. Samozřejmě, že od roku 1988 došlo, i technickým vývojem, ke zlepšení citlivosti a věrohodnosti výsledků instrumentálních mlékařských mikrobiologických analýz, tzn. k omezení frekvence výskytu takovýchto metodických rozdílů v CPM, oproti jejich záznamu na Obr. 1. Mezi jinými byl například realizován analyticko-technologický přechod od daného principu čítání bakterií v nekonečném pásu filmu na povrchu rotujícího disku k jejich

čítání v proudu pufrové kapaliny (flow cytometry), stejně jako některé kroky v biochemické (např. určité enzymatické ošetření) a fyzikální (např. aplikace ultrazvuku) předúpravě bakterií ve vzorku mléka k vlastnímu čítání opticko-elektronických impulsů CPM. Nicméně, existence výskytu určitých specifických vzorků (s ohledem na vztah k principům použitých analytických metod pro CPM) mléka zůstala s nejvyšší pravděpodobností do jisté míry zachována.

Zcela zvláštní kapitolou řešení kalibrace, resp. transformace BEI na CFU, u IBC nebo Bactoscanu versus referenční kulturační metoda, je vyhodnocení variability individuální shody, resp. rozdílů, měření CPM různými metodami. Tato je u těchto mikrobiologických metod relativně výrazně vyšší, než u měření chemických složek mléka referenčními a nepřímými metodami. Proto problém zasluhuje specifický přístup. Při hodnocení celého souboru A ($n = 1\ 651$) činila směrodatná odchylka průměrného rozdílu ± 360 tis.CFU/ml a byla tak velmi vysoká. Hodnoty variability diferencí průměrného rozdílu podobné hodnocení A ($n = 1\ 651$), případně i vyšší, lze odhadovat také z variability dat na Obr. 1 (SUHREN et al., 1988). U redukovaných souborů uříznutím dat klasického CPM ($A \leq 1000$ a ≤ 500 tis.CFU/ml; $n = 1\ 579$ a $1\ 543$) klesla tato směrodatná odchylka průměrné difference mezi metodami na ± 104 a ± 77 tis.CFU/ml. I tak je to hodnota relativně vyšší. Až u redukovaných souborů dat testem odlehlosti na vlastní velikost difference (B a C; $n = 1\ 551$ a $1\ 548$) byl pokles směrodatné odchylky průměrné difference logicky ještě vyšší na ± 35 a ± 36 tis.CFU/ml, a vykazoval relativně žádoucí rozměr. Uvedené znamená, že 67 % rozdílů

výsledků CPM mezi metodami se pohybuje v oborech ± 35 a ± 36 tis.CFU/ml. Relativně, s ohledem na průměr CPM v systému kvality ČR cca 40 tis.CFU/ml je patrné, že se nejedná o hodnotu zcela zanedbatelnou (cca 90 %) v případě řešení případných komerčních sporů o výsledky CPM. U analýz chemického složení mléka (tuk, bílkoviny, laktóza, sušina tukuprostá, sušina celková) je takové korespondující, relativní vyjádření variability metodických diferencí vůči praktickému průměru analytu na úrovni cca 1 až 2, maximálně 3 %. To je zcela diametrální rozdíl oproti mikrobiologickým metodám. Nicméně, takové jsou specifické vlastnosti srovnávání výsledků mikrobiologických analytických metod, které je však nezbytné respektovat.

Uvedené trendy dovolují jako optimum, z důvodů statistických i praktických mikrobiologických analytických argumentů, vybrat pro model validační rovnice ze souborů A (≤ 500 tis.CFU/ml), A ($\leq 1\ 000$ tis.CFU/ml) a B, původních i transformovaných, pro hodnocení celkem ($n = 1\ 543$, $1\ 579$ a $1\ 551$). Modelové hodnocení predikce je provedeno pro prakticky významné hodnoty CPM: 10 (technologická způsobilost současných dojřen); 40 (cca průměr CPM v České republice); 100 (standardní limit CPM v ČR a v Evropské unii); 500 (horní limit užiznutí dat CPM pro prakticky vyhovující hranici vyšší analytické věrohodnosti výsledků CPM) tis.CFU/ml (Tab. 1). Pro teoretické kultivační stanovení CPM (10, 40, 100 a 500 tis.CFU/ml) by rovnice

Tab. 1 Model aplikace selektovaných validačních rovnic ze souborů hodnot původních CPM i logaritmičsky transformovaných pro hodnocení A celkem, A (≤ 500 tis.CFU/ml), A ($\leq 1\ 000$ tis.CFU/ml) a B.

Tab. 1 Model of application of selected validation equations from data files of original and log transformed TCM values for evaluation A in total, A ($\leq 500\ 10^3$ CFU/ml), A ($\leq 1\ 000\ 10^3$ CFU/ml) and B.

S	STAT	n	Data	Validační rovnice	CPM	model	tis.CFU/ml	
					10	40	100	500
A	-	1 651	pův	$y=0,5913x+55,3948$	61	79	115	351
A	-	1 651	log	$y=0,7363x+0,5763$	21	57	112	366
A	≤ 500	1 543	pův	$y=1,0264x+13,8671$	24	55	117	527
A	≤ 500	1 543	log	$y=0,6699x+0,6635$	22	55	101	296
A	$\leq 1\ 000$	1 579	pův	$y=0,9968x+14,5011$	24	54	114	513
A	$\leq 1\ 000$	1 579	log	$y=0,687x+0,6416$	21	55	104	313
B	Grubbs	1 551	pův	$y=0,9801x+12,2801$	22	51	110	502
B	Grubbs	1 551	log	$y=0,6998x+0,6198$	21	55	105	323

(S = soubor; STAT = statistické ošetření souboru; n = počet případů; Data, pův = původní, log = logaritmovaný. S = file; STAT = statistic treatment of file; n = number of cases; Data, pův = original, log = logarithmic transformed.)

Tab. 2 Vybrané kombinace lineárních regresních vztahů výsledků metod pro přepočítání BEI (10^3) na CPM (tis.CFU/ml) a výběr modelu pro modifikaci transformační rovnice.

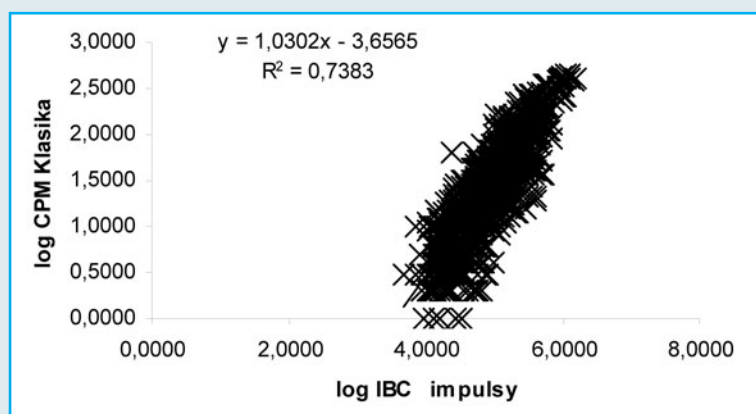
Tab. 2 Selected combinations of linear regression relationships of method results for BEI (10^3) recalculation to TCM (10^3 CFU/ml) and selection of model for transformation equation modification.

Soubor	Kombinace	Rovnice	r	n	BEI	BEI	BEI	BEI	BEI
					10	50	100	200	1 000
	BEI \times CPM	PTR-IBC			6	25	47	89	381
A1	BEI \times CPM	$y=0,0002x+29,0678$	0,667	1 543	31	39	49	69	229
A1	logBEI \times logCPM	$y=0,9885x-3,454$	0,849	1 543	3	16	31	61	300
B1	BEI \times CPM	$y=0,003x+1,9336$	0,881	1 517	5	17	32	62	302
B1	logBEI \times logCPM	$y=1,0302x-3,6565$	0,859	1 517	3	15	31	64	335
B	logBEI \times logCPM	$y=1,028x-3,6457$	0,885	1 551	3	15	31	64	333
B1	logBEI \times CPM	$y=118,4107x-533,8312$	0,736	1 517	-60	23	58	94	177
B	logBEI \times CPM	$y=272,6255x-1281,9143$	0,635	1 551	-191	-1	81	163	354

(Všechny vztahy, $P \leq 0,001$; n = počet případů; r = korelační koeficient; PTR-IBC = původní transformační rovnice IBC. All relationships, $P \leq 0,001$; n = number of cases; r = correlation coefficient; PTR-IBC = former transformation IBC equation; CPM = TCM.)

pro dané validační soubory s použitou původní transformační rovnicí (z BEI na CPM) vykazovaly v tabulce uvedené instrumentální (transformované) CPM. Z tohoto modelového vyhodnocení lze odvodit, že nevhodnějšími soubory pro odvození nové transformační rovnice celkové a pro jednotlivé přístroje jsou soubory A (≤ 500 tis.CFU/ml) a B (s Grubbovým testem odlehlosti metodických rozdílů na hladině intervalu pravděpodobnosti 95 %).

Byly provedeny výpočty kombinací lineárních regresí vztahů výsledků BEI a CFU pro CPM mezi metodami uvnitř celých a redukováných, transformovaných a netransformovaných (IBC BEI a CPM CFU) a někdy specificky selektovaných souborů dat. To bylo provedeno pro soubory celkem ($n = 1\ 651$), A1 (≤ 500 tis.CFU/ml, $n = 1\ 543$), B ($n = 1\ 551$) a byl vytvořen nový soubor B1 (B a ≤ 500 tis.CFU/ml, $n = 1\ 517$). Z cíleně vybraných vztahů byly, s ohledem na výsledky původní transfor-



Obr. 2 Varianta v souboru B1 s lineární kombinací vztahu log BEI (IBC) \times log CPM referenčně (kultivačně).

Fig. 2 Variant in B1 data file with linear combination of relationship log BEI (IBC) \times log TCM by reference (cultivation).

Tab. 3 Přiblížení nové transformační rovnice IBC ke vztahu $\log BEI$ (IBC) \times \log CPM referenčně z Tab. 2 (B1, $n = 1\ 517$), přepočítání BEI (10^3) na CPM (tis.CFU/ml).

Tab. 3 Approximation of new transformation IBC equation to relationship $\log BEI$ (IBC) \times \log TCM by reference from Tab. 2 (B1, $n = 1\ 517$), BEI (10^3) recalculation to TCM (10^3 CFU/ml).

Kombinace	Rovnice	BEI	BEI	BEI	BEI	BEI
		10	50	100	200	1 000
BEI \times CPM	PTR-IBC	6	25	47	89	381
BEI \times CPM	PTR-IBC	6	25	47	89	381
$\log BEI \times \log CPM$	$y = 1,0302x - 3,6565$ NTR-IBC	3	15	31	64	335
BEI \times CPM	NTR-IBC	3	15,7	31,9	64,8	335,2

(NTR-IBC = nová transformační rovnice IBC, přepsaná a modifikovaná.
NTR-IBC = new transformation IBC equation, transliterated and modified.)

mační rovnice, provedeny modelové přepočty (Tab. 2) podle specifických IBC-BEI, odpovídajících přibližně významným, aktuálně-praktickým (kvalita mléka), potravinářsky-legislativním a laboratorně-analyticky-praktickým limitům (10 000, 50 000, 100 000, 200 000, a 1 000 000 BEI).

Porovnání ukázalo (Tab. 2), že, z řady analyticko-laboratorně praktických a teoreticko-statistických důvodů, nejvhodnější předlohou pro modifikaci původní transformační rovnice IBC (z BEI na CPM, resp. CFU) na novou verzi, je nová varianta souboru B1 s lineární kombinací vztahu $\log BEI$ (IBC) \times \log CPM referenčně (kultivačně) $y = 1,0302x - 3,6565$ ($r = 0,859$; $P \leq 0,001$; $n = 1\ 517$; Obr. 2). Uvedený vztah se stal předlohou (modelem) pro přepis i modifikaci původní transformační rovnice. Podobným způsobem je, podle lineárních modelů, možné, v případě zvláštní analytické potřeby, přepsat a modifikovat specifické přístrojové transformační rovnice. V Tab. 3 je znázorněno přiblížení nové transformační rovnice IBC ke vztahu $\log BEI$ (IBC) \times \log CPM referenčně z Tab. 2. Je patrné, že modifikovaná nová přístrojová verze rovnice kopíruje modelové hodnoty BEI a následně CPM metodicky odvozené lineární transformační rovnice. V celkovém referenčním souboru zachycené minimální a maximální hodnoty BEI (4 815 a 14 374 479) poskytují po přepočtu hodnoty CPM 1,443 a 5 095,672 tis.CFU/ml a tedy i okraje rovnice vyhovují praktickým podmínkám při kontrole kvality syrového mléka.

S novou a modifikovanou transformační rovnicí byl proveden přepočítání původních BEI (nápočtová hodnota průtočné cytometrie) vybraných datových souborů a provedena statistická validace nově navrženého postupu. Byla provedena základní a diferenční statistika u souborů celkem ($n = 1\ 651$), A1 ($n = 1\ 543$), B ($n = 1\ 551$) a zejména B1 (1 517) mezi IBC CPM (nová transformační rovnice), IBC CPM (původní transformační rovnice) a CPM referenčně (kultivačně, klasicky) a obdobně lineární regrese původních a logaritmicky transformovaných dat CPM mezi IBC CPM (nová přepsaná a modifikovaná transformační rovnice) a CPM klasicky. Validace účinnosti nové přepsané a modifikované transformační rovnice ukázala dobrou shodu výsledků se statistickými parametry referenčního souboru CPM. Byl tedy potvrzen posun dolů na průměru CPM cca o 15 tis.CFU/ml.

Závěr

Je možné odhadovat, že původní přepočítová rovnice pro BEI by stále ještě procházela případnými výkonnostními testy analytické způsobilosti a věrohodnosti výsledků, i když poskytovala, pravděpodobně z diskutovaných důvodů, mírně vyšší výsledky CPM. Tento jev může být důsledkem toho, kdy za dobu její aplikace (cca 10 let) mohlo dojít k posunu ve skladbě CPM a celkové mikroflóry mléka v chovech dojníc s ohledem na technologické skupiny bakterií (ve vazbě na optimálně vhodné

jejich kultivační teploty) v důsledku specifických hygienických režimů dojení nebo antibiotické léčby krav a tím k uplatnění změněných interferenčních efektů na vztah mezi výsledky obou metod (IBC CF a RE) stanovení CPM. Validace výsledků IBC FC CPM výsledky klasickými kultivačními poukázala na potřebu derivace rovnice nové. Redukce původního souboru dat CPM o odlehle hodnoty vlastních měření, nebo rozdílů mezi výsledky metod, přinesla mírný pokles těsnosti vztahu výsledků metod (IBC a klasicky), ale také redukcí variability metodických rozdílů ve stanovení CPM. Z porovnání vyplynulo, že nejvhodnějšími soubory, po statistickém ošetření, pro odvození nové transformační rovnice z BEI IBC na CPM v CFU jsou: - soubor po redukcí hodnot CPM (≤ 500 tis.CFU/ml; - soubor po redukcí metodických diferencí testem odlehlosti. Nový model transformační rovnice má tvar: $\log BEI$ (IBC) \times \log CPM referenčně (kultivačně) $y = 1,0302x - 3,6565$. Validace účinnosti nové přepsané a modifikované transformační rovnice ukázala dobrou shodu výsledků se statistickými parametry referenčního souboru CPM. Byl tedy potvrzen posun dolů na průměru CPM cca o 15 tis.CFU/ml. Z výsledků také vyplývá, metodou kvalifikovaného odhadu, že následně rekalkulace transformační rovnice CPM (z BEI na CFU/ml) by měly být prováděny cca po 5 až 8 letech.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory projektu MZe NAZV KUS QJ1210301.

Literární reference

- ALI, A. K. A.- SHOOK, G. E. (1980): An optimum transformation for somatic cells concentration in milk. *J. Dairy Sci.*, 63, 487-490.
- BOLZONI, G.- MARCOLINI, A.- VARISCO, G. (2000): Evaluation of the Bactoscan FC. 1. Accuracy, comparison with Bactoscan 8000 and somatic cells effect. *Milchwissenschaft*, 55, 67-80.
- BOLZONI, G.- MARCOLINI, A.- VARISCO, G. (2001): Evaluation of the Bactoscan FC. 2. Stability, repeatability, carry-over and linearity. *Milchwissenschaft*, 56, 318-321.
- ČSN EN ISO 4833-1: Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. European Committee for Standardization, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, EN ISO/IEC 17025, Brussels, Belgium, 1999.

- ČSN EN ISO 4833-2: Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 2: Počet kolonií při 30 °C prostřednictvím povrchové plotnové metody. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 2: Colony count at 30 degrees C by the surface plating technique. 2013.
- EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION (ECS): Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C, EN ISO 4833, Brussels, Belgium, 2003.
- EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION (ECS): Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods, EN ISO 16140, Brussels, Belgium, 2003.
- HANUŠ, O.- JANŮ, L.- SCHUSTER, J.- KUČERA, J.- VYLETĚLOVÁ, M.- GENČUROVÁ, V. (2011): Exploratory analysis of dynamics of frequency distribution of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LIX, 1, 83-100.
- HANUŠ, O.- JANŮ, L.- VYLETĚLOVÁ, M.- KUČERA, J. (2009): Research and development of a synthetic quality indicator for raw milk assessment. *Folia Veter.*, 53, 2, 90-100.
- HANUŠ, O.- JANŮ, L.- VYLETĚLOVÁ, M.- MACEK, A. (2007): Validace použitelnosti algoritmu relativního syntetického ukazatele kvality syrového mléka (SQSM) pro konzistentní modifikaci farmářské ceny. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, LV, 5, 71-82.
- JANŮ, L.- HANUŠ, O.- BAUMGARTNER, C.- MACEK, A.- JEDELSKÁ, R. (2007): The analysis of state, dynamics and properties of raw cow milk quality indicators in the Czech Republic. *Acta Fytotech. Zootech.*, 10, 3, 74-85.
- NINANE, V.- DE REU, K.- OGER, R.- REYBROECK, W.- GUYOT, A. (2000): Evaluation du Bactoscan FC pour la numération des bactéries du lait cru. *Lait*, 80, 527-538.
- REICHMUTH, J.- SUHREN, G.- UBBEN, E. H.- HEESCHEN, H. (1988): Die Anwendung der Linearitätshypothese beim Bactoscan-Verfahren. *Deutsche Molkerei-Zeitung*, 109, 42, 1308-1312.
- RENEAU, J. K. (1986): Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. *J. Dairy Sci.*, 69, 1708-1720.
- SHOOK, G. E. (1982): Approaches to summarizing somatic cell count which improve interpretability. *Nat. Mast. Council*, Louisville, Kentucky 1-17.
- STN 57 0539: Automatizované stanovenie mikroorganizmov v surovom mlieku s priamym počítaním bakteriálnych buniek. Slovenský ústav technickej normalizácie, Bratislava, 2003.
- SUHREN, G.- REICHMUTH, J. (2000): Interpretation of quantitative microbiological results. *Milchwissenschaft*, 55, 18-22.
- SUHREN, G.- REICHMUTH, J.- HEESCHEN, H. (1988): Zur Messung der bakteriologischen Beschaffenheit der Rohmilch mit dem Bactoscan-Gerät. *Deutsche Molkerei-Zeitung*, 109, 44, 3-11.
- SUHREN, G.- REICHMUTH, J.- WALTE, H. G. (2001): Bacteriological quality of raw milk: Conversion of Bactoscan-FC counts onto the scale of the official method. *Milchwissenschaft*, 56, 380-384.
- SUHREN, G.- WALTE, H. G. (1998): First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.*, 50, 249-275.
- SUHREN, G.- WALTE, H. G. (2001): Determination of precision data of the Bactoscan FC-method by an interlaboratory study. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.*, 53, 269-282.
- SUHREN, G.- WALTE, H. G.- REICHMUTH, J. (2000): Zum Einsatz der automatisierten Durchflusssytometrie als Routinemethode für die Erfassung der bakteriologischen Qualität von Anlieferungsmilch. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.*, 52, 97-143.
- 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*, 86, 127-140.

Přijato do tisku: 18. 5. 2016

Lektorováno: 2. 6. 2016

MASTNÉ KYSELINY MLÉČNÉHO TUKU A VÝVOJ LEGISLATIVY VE VZTAHU K NIM

Jana Koubová, Eva Samková, Lucie Hasoňová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice

Milk fatty acids and development of legislation relating to fatty acids

Souhrn

Složení potravin je pro konečného spotřebitele důležitým kritériem výběru. Právní předpisy určují pravidla pro poskytování informací týkajících se potravin, ať už se jedná o informace povinné či dobrovolné. Práce byla zaměřena na označování potravin ve vztahu k mastným kyselinám, jejichž zastoupení v potravinách živočišného původu, tedy i mléčného tuku, jsou často diskutovány. Součástí publikace je i výčet výživových a zdravotních tvrzení souvisejících s mastnými kyselinami, a rovněž doporučení ohledně spotřeby tuků a mastných kyselin.

Klíčová slova: mléčný tuk, mastné kyseliny, výživová a zdravotní tvrzení

Summary

The composition of foods is an important selection criterion for final consumers. Rules of providing of information about food, both compulsory and voluntary, are determined by legislation. The work was focused on food labelling in relation to fatty acids. Their proportion is often discussed in animal foods, including milk fat. A part of the article is a list of nutrition and health claims relating to fatty acids and also recommendations for consumption of fats and fatty acids.

Keywords: milk fat, fatty acids, nutrition and health claims

Úvod

Lipidy jsou spolu s bílkovinami a sacharidy nezbytnou základní živinou pro všechny živočichy včetně člověka. Představují nejbohatší zdroj energie, dále jsou zdrojem esenciálních mastných kyselin linolové a alfa-linolenové a významných látek rozpustných v tucích (vitaminů, prekurzorů hormonů a dalších). Přítomnost lipidů v potravinách také výrazně ovlivňuje jejich senzorycké vlastnosti.

Lipidy živočišného původu, kam řadíme i mléčný tuk, jsou však z nutričního hlediska v porovnání s rostlinnými oleji hodnoceny spíše negativně pro své vyšší zastoupení nasycených mastných kyselin i obsah cholesterolu, tedy faktorů spojovaných s vývojem srdečně cévních či dalších