

Opravný list k dizertační práci

Téma: Úroveň energetického metabolismu dojníc a složení mléčného tuku
Autorka práce: Ing. Jitka Kautská
Str. 33 Doplnění metodiky odběru vzorků a jejich následné analýzy

4 Materiál a metodika

4.1 Charakteristika podniku

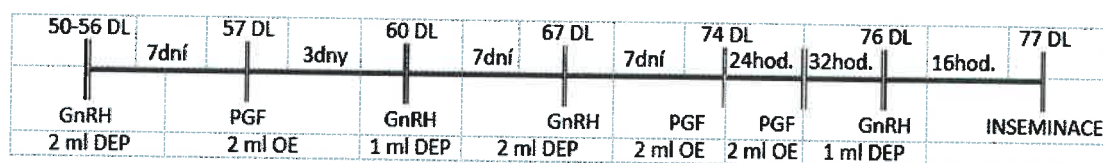
Agropodnik Košetice, a.s. vznikl v roce 2003 změnou právní formy (na akciovou společnost) z původního družstva Agrodružstvo Košetice, které vzniklo v roce 1976 sloučením JZD Košetice, JZD Buřenice a JZD Chyšná. Podle těchto původních družstev je i dnes společnost rozdělena do tří středisek – středisko Košetice, Buřenice a Chyšná. V současné době Agropodnik Košetice, a.s. obhospodařuje přibližně celkem 2 850 ha. Podnik hospodaří na Českomoravské vrchovině, nadmořská výška se pohybuje v rozmezí 494–570 m n.m.

Průměrná roční teplota je 7,4 °C. Klimatickým podmínkám na Vysočině je přizpůsobena struktura rostlinné výroby, kde stěžejní část tvoří výroba krmné základny pro živočišnou výrobu (kukuřice, výroba senází atd.), dále společnost pěstuje brambory sadbové i konzumní, potravinářskou pšenici, řepku, v menší míře ječmen, oves a další. Živočišná výroba se zaměřuje na chov skotu holštýnského plemene, především na výrobu mléka a produkci hovězího masa. Velký význam má chov prasat a chov kuřat. V živočišné výrobě se podnik zaměřuje hlavně na chov skotu v počtu 2 530 kusů, z toho 1 030 kusů dojníc holštýnského plemene s průměrnou dojivostí 11 553 kg mléka.

4.1.1 Reprodukční ukazatele

V chovu je využívána biotechnická metoda zaměřená na zjednodušení procesu vyhledávání říjí a inseminace – OVSYNCH. Cílem je minimalizovat chyby při vyhledávání nevýrazných říjí u dojníc a dosáhnout tak lepších reprodukčních parametrů v chovu. Pro zlepšení termínu inseminace se používá kombinace luteolýzy a vyprovokování ovulace realeasing hormonem se selektivním LH účinkem. Jalovice jsou inseminovány ve 13. měsíci věku. Protokol řízené reprodukce je uveden na obrázku 4.1 a 4.2.

Obrázek 4.1: Double ovsynch protokol – schéma



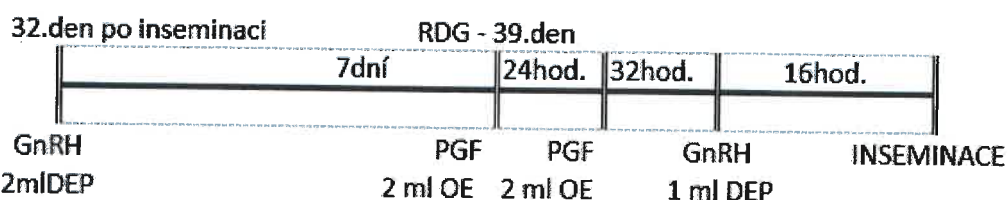
Týden	Po	Út	St	Čt	Pá	So	Ne
1					2ml DEP		
Týden	Po	Út	St	Čt	Pá	So	Ne
2					2ml OE		
Týden	Po	Út	St	Čt	Pá	So	Ne
3	1ml DEP						
Týden	Po	Út	St	Čt	Pá	So	Ne
4	2ml DEP						
Týden	Po-10:00	Út-10:00	St-18:00	Čt-10:00	Pá	So	Ne
5	2ml OE	2ml OE	1ml DEP	Insem.			

*DL – dny laktace

*OE – oestrophan

*DEP - Dephereli

Obrázek 4.2: Resynch protokol – schéma



Týden	Po	Út	St	Čt	Pá	So	Ne
1	2 ml DEP						
Týden	Po-10:00	Út-10:00	St-18:00	Čt-10:00	Pá	So	Ne
2	2 ml OE	2 ml OE	1 ml DEP	Insem.			

4.1.2 Ukazatele užitkovosti

Dojnice jsou dojeny 3× denně v rybinové dojárně 2×12 míst. Průměrná produkce za laktaci je 27,63 litrů/dojnicí. Průměrná roční dojivost je 11 553 litrů/dojnicí, 9 940 litrů/prvotelky. Mastitidní dojnice jsou ve skupinách společně s ostatními dojnícemi, nejsou oddělené v samostatné skupině. Brakace dosahuje hodnot maximálně 30 %. Důvodem jsou především nízká užitkovost, těžce léčitelné mastitidy (chronické mastitidy), onemocnění končetin, nízká plodnost a těžké porody.

Průměrné hodnoty vybraných kvalitativních parametrů mléka u dojnic zařazených do pokusů jsou uvedeny v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1: Průměrné hodnoty běžně sledovaných parametrů v mléce v období pokusu

Parametr	Hodnota
Obsah tuku (%)	4,14
Obsah bílkovin (%)	3,32
Celkový počet mikroorganismů (v 1 ml)	9 000
Počet somatických buněk (v 1 ml)	186 000
Bod mrznutí (°C)	-0,5284
Obsah močoviny (mmol/l)	4,26
Rezidua inhibičních látek	negativní
Poměr tuk/bílkovina	1,25

4.1.3 Zhodnocení krmné dávky

Krmná dávka je zakládána na krmnou chodbu. Pro jednotlivé skupiny dojnic je sestavována krmná dávka individuálně: rozdoj, dojnice na vrcholu laktace, na konci laktace, březí dojnice před porodem a suchostojné. Složení krmné dávky je uvedeno v tabulce 4.2.

Tabulka 4.2: Složení krmné dávky pro jednotlivé skupiny dojnic (kg/ks/den)

	Rozdoj	Vrchol laktace	Konec laktace	Suchostojné krávy a březí jalovice
Směs	8,60	9,60	3,80	-
Šrot obilí	2,00	2,30	2,80	
Sláma				3
Seno	1	-		1
Pšenice vak	-	-		-
Jetel strnišť	4	5	4	4
Melasa	0,80	0,80	0,80	
Senáž (jetelová)	5	6	20	6
Siláž (kukuřice)	19	21	7	12
Předporodní směs	-	-	-	2,60
Směs na porodnu	-	-	-	1,7
Primasan		-	-	0,17
GPS – oves		-	-	-

4.1.4 Technologie ustájení

Dojnice jsou ve volném ustájení se stlanými boxy. Krmení je zakládáno krmným vozem na krmnou chodbu, délka krmného stolu je 10–20 cm na dojnici. Porodní boxy jsou s hlubokou podestýlkou. Porody v noci nejsou hlídány, přesun krav na porodnu probíhá 21 dní před porodem. Dojnice jsou zasušovány plošně antibiotiky 54 dní před porodem. Napáječky jsou pravidelně rozmístěné po ustájení v dostatečném množství (jedna napáječka na 15–20 dojnic).

Po porodu jsou telata přesouvána do VIB (venkovní individuální box) maximálně do dvou hodin. Do dvou hodin je také telatům podáno první mlezivo. V případě, že jsou telata neochotná pít, používá se krmení jícnovou sondou. Pokud jsou naplánovány přesuny telat, uskutečňují se mezi 14. – 21. dnem. Pokud telata zůstávají ve VIB, jsou po 56 dnech přesunuta do teletníků.

4.1.5 Zdravotní stav

Dvakrát ročně probíhá v chovu kompletní ošetření paznehtů specializovanou firmou. Individuální úpravu a ošetření paznehtů zajišťují zootechnici. Jednou měsíčně se provádí koupel ve venkovním bazénu s formalínem a dvakrát týdně jsou paznehty ošetřeny v průchozích vanách na dojírně formalínem, hypermanganem nebo modrou skalicí. V chovu probíhá vakcinace na Blue-Tongue přípravkem ZULVAC 8 Bovis, vakcinace proti BVD (bovinní virová diarrhoea), BRSV (bovinní respirační syncytiální virus), a PI3 (virus boviní parainfluenzy). Telata jsou očkována proti trichofytóze před přechodem do centrálního teletníku. Jednou ročně jsou odebírány krve pro vyšetření na IBR (infekční boviní rhinotracheitida) a brucelózu.

U telat se provádí kontrola koncentrace imunoglobulinů ve věku do 21 dní z krve metodou srážení síranem zinečnatým. Antiparazitární ochrana se u telat neprovádí. Nejčastější zdravotní komplikace jsou uvedeny v tabulce 4.3.

Tabulka 4.3: Nejčastější zdravotní komplikace

Reprodukční problematika	Zadržení lůžka, endometritidy, metritidy, poporodní paréza	15 %
Zdravotní komplikace v průběhu produkce	Mastitidy	30 %
Metabolická onemocnění	Ketózy, acidózy, dislokace slezu	28 %
Respirační onemocnění	Respirační syndrom telat	10 %
Porody	Porody s nutnou asistencí, aborty	5 %
Onemocnění paznehtů	Digitální dermatitida, hniloba, Rusterholzův vřed, nekrobacilóza, difuzní zánět škrky paznehtní	29 %

4.2 Metodika

4.2.1 Výběr dojnic, metodika pokusů

Ve vybraném chovu dojených krav s užitkovostí 9-11 tisíc litrů mléka za laktaci byly v letech 2015 až 2017 v rámci pravidelné kontroly užitkovosti na základě smluv s oprávněnými organizacemi odebrány individuální vzorky mléka pro analýzu zastoupení mastných kyselin v mléce. Souběžně byly ve vzorcích mléka stanoveny parametry energetického metabolismu a ostatní jakostní a chemické parametry mléka.

Úroveň energetického metabolismu ve vztahu ke složení mléčného tuku (Výsledky a diskuse, kapitola 5.1)

Pro hodnocení vztahů mezi parametry energetického metabolismu a obsahem mastných kyselin v mléčném tuku byly vybrány dojnice ze čtyř kontrol užitkovosti, a to z října a listopadu 2015 a června a července 2016. Dojnice byly rozděleny do 3 skupin: 1. skupina, do 30 dnů laktace (n=123), 2. skupina, 31-60 dnů (n=129) a 3. skupina, 61-100 dní laktace (n=210).

Vyhodnocení účinku monenzinu 1 (Výsledky a diskuse, kapitola 5.2)

V rámci pokusného sledování účinku intraruminálně aplikovaného bolusu (inzertu) s postupným uvolňováním monenzinu byla vybrané skupině dojnic plemene holštýnské ve stádě s objektivně zvýšenou incidencí ketóz odebrána krev a mléko (pokusná skupina). Souběžně s touto skupinou byl uskutečněn odběr i u neošetřených dojnic (kontrolní skupina). Dojnice do pokusné a kontrolní skupiny byly vybírány tak, aby se neodlišovaly v užitkovosti. Pro tuto informaci byly využity výsledky předcházející užitkovosti: 1) produkce za 100 denní laktaci a

2) průměrný denní nádoj za 100 denní laktaci. Byla vybírána zvířata pouze bez klinických projevů onemocnění, s fyziologickým průběhem puerperia, bez onemocnění končetin.

Tabulka 4.4: Výběr pokusné a kontrolní skupiny – užitkovost za 100 denní laktaci a průměrný denní nádoj za 100 dní laktace v kg

Skupina	100 denní laktace	Denní nádoj
pokusná	3 623	36,2
kontrolní	3 637	36,3

V celkem 11 termínech, od června 2016 do listopadu 2017, bylo odebráno 158 vzorků mléka a krve. V jednotlivých odběrových termínech bylo odebráno 9 až 18 vzorků, průměrný počet odebraných vzorků byl 14.

Hodnocení účinku monenzinu na energetický metabolismus proběhlo ve dvou pokusech: 1. pokus, od 26. 10. 2016 do 25. 4. 2017; 2. pokus, od 4. 10. 2017 do 23. 11. 2017.

Vyhodnocení účinku monenzinu 2 (Výsledky a diskuse, kapitola 5.3)

Sledování proběhlo v chovu dojníc holštýnského plemene, s průměrnou užitkovostí 10.963 kg za laktaci. Metodika pokusu je uvedena v Příloze 1.

4.2.2 Aplikace monenzinu dojnicím a jeho působení

Monenzin byl dojnicím/jalovicím podáván ve formě bolusu – intraruminálního inzertu s obsahem monenzinu 32,4 g s kontinuálním uvolňováním v součinnosti s veterinárním lékařem. Inzert je válcovitého tvaru, tělo inzertu je opatřeno křídélky, a označeno unikátním číslem. Inzert obsahuje 12 podjednotek, každá z podjednotek obsahuje 2,7 g monenzinu, po dobu asi 95 dnů dochází k uvolňování průměrně 335 mg monenzinu za den. Inzert byl dojnicím podáván tři týdny před předpokládaným otelením.

Po podání inzertu byly dojnice drženy v uzavřených prostorách po dobu jedné hodiny po podání, aby bylo možné sledovat neúspěšné polknutí nebo regurgitaci. Pokud k nim dojde, je možné nepoškozený inzert znovu podat. Nelze opětovně podávat poškozený inzert. V průběhu dalších čtyř dní byly dojnice kontrolovány, zda nevykazují příznaky uvíznutí intraruminálního inzertu v jícnu. Po podání intraruminálního inzertu je mléko i maso bez ochranných lhůt.

4.2.3 Odběry vzorků krve a mléka

Krev byla odebírána z ocasní žíly, pro získání séra do sterilní odběrové soupravy HEMOS-01, případně skleněných zkumavek, pro získání krevní plazmy do zkumavek s heparinem a pro

vyšetření hematologických parametrů do zkumavek s antikoagulačním prostředkem EDTA. Po odběru byla krev uložena do termoboxu a převezena do laboratoře Fakulty zemědělské a technologické Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (FZT JU). Vzorky byly odebírány v dopoledních hodinách.

Individuální vzorky mléka (průměrný vzorek ze dvou dojení) byly odebírány v rámci kontroly užitkovosti, ve stejný den jako vzorky krve. Současně byla sledována i denní dojivost v kg. Od každé dojnice byly odebrány dva vzorky: jeden byl zaslán do Laboratoře pro rozbor mléka v Buštěhradě Českomoravského svazu chovatelů (LRM), druhý v termoboxu společně s krví do laboratoře FZT JU.

4.3 Analýza vzorků

4.3.1 Analýza mléka

Analýzy mléka probíhaly v LRM a na FZT JU. Pro analýzu základního složení mléka a zastoupení mastných kyselin v mléce v LRM byla zvolena metoda infračervené spektroskopie ve středové oblasti s využitím Fourierových informací (MIR-FT). Jedná se o metodu nepřímého (rutinního) stanovení zastoupení mastných kyselin. Pro tento účel bylo využito zařízení CombiFoss FT+ (Foss Analytical A/S, Denmark) sestávající z kombinace přístrojů MilkoScan FT+ 76150 a Fossomatic FC 79910. Kapacita tohoto zařízení umožňuje zpracovat 500 vzorků za hodinu.

Ve vzorcích mléka byly výše uvedenou metodou stanoveny následující ukazatele:

- složení mléka – mléčný tuk, bílkovina, laktóza, poměr tuk/bílkovina (T/B), aceton, kyselina beta hydroxymáselná (BHB), močovina
- obsah mastných kyselin a jejich skupin v mléce (g/100 g mléka) – mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), mastné kyseliny se střední délkou řetězce (MCFA), mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (LCFA), nasycené mastné kyseliny (SFA), mono- (MUFA) a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), kyselina palmitová, kyselina stearová, kyselina olejová.

V laboratoři FZT JU byly stanoveny tyto parametry:

1. obsah mědi (Cu) a zinku (Zn) atomovou absorpční spektrometrií (AAS)
2. obsah jódu spalovací alkalickou metodou dle Sandell-Kolthoffa

4.3.2 Analýza krve

Stanovení hematologických parametrů bylo prováděno z plné krve ještě v den odběru, tedy asi do šesti hodin po odběru, biochemické parametry z krevní plazmy nejpozději den po odběru. Pro analýzy TSH a hormonů štítné žlázy T4 a T3 byly krevní sérum, resp. krevní plazma uchovávány do vlastní analýzy (většinou do jednoho měsíce) při -20 °C.

Všechny analýzy krve byly provedeny v hematologické a biochemické laboratoři FZT JU, jednotlivé metody, resp. přístroje jsou uvedeny v závorce.

Ve vzorcích krve (krevní plazmy, krevního séra) byly stanoveny:

1. parametry energetického metabolismu: z krevní plazmy, kyselina β -hydroxymáselná, glukóza, cholesterol, triacylglyceroly, bílkoviny krevní plazmy, močovina, jaterní enzymy (biochemický analyzátor Ellipse, spektroskopické metody)
2. hormony štítné žlázy T3, T4 a jejich volné frakce: z krevní plazmy (RIA metoda, testy od firmy Beckman Coulter Praha)
3. TSH: z krevního séra (ELISA metoda (sendvičová metoda), testy od firmy SEDIUM Research and Development Pardubice)

4.4 Statistické vyhodnocení dat

Pro výpočty a statistické vyhodnocení byly zvoleny programy Microsoft Office Excel a Statistica (StatSoft CR s.r.o.).

Mastné kyseliny získané rutinní metodou (g/100 g mléka) byly přepočítány na hodnoty odpovídající vyjádření referenční metody, tedy plynové chromatografie (g/100 g všech mastných kyselin) podle vzorce: $(A_n * 100)/(B_n * 0,95)$, kde **A_n** je hodnota mastné kyseliny vyjádřená v g/100 g mléka, **B_n** je hodnota obsahu tuku v g/100 g mléka a 0,95 je koeficient přepočtu obsahu tuku na mastné kyseliny.

Pro účely statistického vyhodnocení naměřených dat byly jako **nezávislé proměnné (faktory)** použity následující ukazatele:

- stadium laktace: 1 (do 30 dnů laktace); 2 (31–60 dní laktace); 3 (61–100 dní laktace)
- obsah BHB: 1 ($>0,20$ mmol/l); 2 (0,10–0,20 mmol/l); 3 ($<0,10$ mmol/l laktace)
- skupina dojnic: 1 (pokusná skupina), 2 (kontrolní skupina)

Sledovanými proměnnými byly:

- denní dojivost (kg), průměrný obsah tuku (%) a průměrný obsah bílkovin (%); poměr tuk/bílkovina (T/B), obsah acetonu, kyseliny beta hydroxymásečné (BHB), močoviny, mědi, zinku a jódu
- skupiny mastných kyselin dle délky řetězce (SCFA, MCFA a LCFA) a nasycení (SFA, MUFA, PUFA), kyseliny palmitová, stearová a olejová
- krevní ukazatele: kyselina β -hydroxymásečná, glukóza, cholesterol, triacylglyceroly, bílkoviny krevní plazmy, močovina, jaterní enzymy
- T3, T4 a jejich volné frakce

Pro analýzu nezávislých proměnných byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA), v případě rozdílů bylo následné porovnání mezi skupinami provedeno pomocí Tukeyova HSD testu pro nestejný počet N. Homogenita rozptylu souborů byla ověřena pomocí Levenova testu. Statistická významnost byla vyhodnocena při obvyklých hladinách významnosti ($p < 0,05$; 0,01; 0,001).

Vztahy mezi obsahem ketolátek v mléce nebo hormonů štítné žlázy a mastnými kyselinami v mléce (n=158) byly vyhodnoceny pomocí korelační analýzy.

