

**Postup použití a vyhodnocení účinnosti přípravku s včelím medem,
propolisem a konopným olejem (Cannapro DCT)**

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

Zpracovali dne: 5. 10. 2018

doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D.¹, prof. Ing. Hanuš Oto, Ph.D.¹, doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D.², , Mgr. Jan Říha, Ph.D.³

¹Výzkumný ústav mlékařenský, s.r.o., Praha; ²Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno; ³Bentley Czech s.r.o., Praha

Úvod

Bakteriální infekce mléčné žlázy je časté a hlavně terapeuticky finančně náročné onemocnění nejen u dojnic, ale i u malých přežvýkavců (Menzies a Ramanan, 2001; Gelasakis a kol., 2015). *Staphylococcus aureus* je jedním z nejdůležitějších původců onemocnění, dále následuje *Streptococcus uberis*, koaguláza-negativní stafylokoky (CNS, převážně *S. haemolyticus*), *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus* spp. a *Escherichia coli* (Vyletelova-Klimesova a kol., 2014; Bogdanovičová a kol., 2016). V poslední době je zaznamenán rostoucí trend výskytu multirezistentních kmenů, které představují závažný celosvětový problém (www.efsa.europa.eu). Mezi rezistentní bakterie rozšířené v humánní i ve veterinární populaci s potenciálem vzniku závažných forem onemocnění se řadí hlavně: methicillin-rezistentní *S. aureus*, vankomycin-rezistentní *Enterococcus* spp., multi-rezistentní *Mycobacterium tuberculosis*, carbapenem-rezistentní bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* (Rattan a kol., 1998; Gupta a kol., 2011; Vyleťlová a kol., 2011; Manga a Vyleťlová, 2013). Některé typy rezistence jsou přenosné tzv. horizontální cestou, kdy dochází k přenosu determinant rezistence ne z mateřské na dceřinou buňku, ale mezi bakteriemi vzájemně, často bez ohledu na příslušnost k čeledi, rodu či druhu. Bloemendaal a kol. (2010) potvrdili hypotézu horizontálního přenosu chromozomálních kazet obsahujících gen *mec* z druhu *Staphylococcus epidermidis* na methicilin citlivý kmen *S. aureus* a vznik methicilin rezistentních klonů *S. aureus* - MRSA.

Cílem evropské lékové politiky je omezovat ve veterinární sféře používání antibiotik (ATB) a to zejména těch s vysokým potenciálem k rozvoji závažných typů rezistence, jakými jsou např. cefalosporiny 3. a 4. generace, fluorochinolony a kolistin. Důraz je kladen na uvážlivé používání antibiotik, jež nemají být aplikována preventivně a empiricky, ale až po laboratorní analýze původce a určení jeho rezistence k antibiotikům. S ohledem na dosažení racionálního využívání antibiotik v zemědělské praxi se do popředí zájmu dostávají alternativní způsoby léčby. Výhodou jejich aplikace oproti antibiotikům je menší finanční náročnost při výrobě preparátů a nižší pravděpodobnost vzniku rezistence. Mezi možné alternativní prostředky se řadí např. rostlinné extrakty, rostlinný olej, med nebo i pylová zrna obsažená v medu. Antimikrobiální aktivita medu je známá více jak 2000 let, tedy ještě před používáním antibiotik. Taormina a kol. (2001) popsali inhibiční efekt k přibližně 60 bakteriálním druhům, zahrnujícím aerobní i anaerobní a grampozitivní a gramnegativní bakterie. Lusby a kol. (2005) popisují rovněž antimikrobiální účinek různých druhů medu u 12 bakteriálních druhů. Vorlová a kol. (2005) a Klimešová a kol. (2017) potvrzují inhibiční

účinek medu u bakteriálních druhů, vyskytujících se i v prostředí chovů hospodářských zvířat (*S. aureus*, *E. coli*). Inhibiční efekt pylu na aerobní patogenní mikroorganismy např. *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* již sledovali někteří vědci (Cooper a kol., 2002; Erkmén a Özcan, 2008; Hleba a kol., 2013; Märgäoan a kol., 2015). Kačániová a kol. (2014) potvrdili i antibakteriální efekt pylových rousků (směs pylových zrn) na anaerobní bakterie rodu *Clostridium*, přičemž nejvyšší antimikrobiální aktivita byla pozorována na *C. perfringens* a *C. butyricum*. Inhibiční účinek pylových rousků s obsahem konopných pylových zrn potvrdili ve své práci i Klimešová a kol. (2018). Bogdanov (1997) také uvádí, že antimikrobiální aktivita je významně závislá na rostlinném původu medu.

Antibakteriální účinky propolisu jsou dokázány převážně u grampozitivních bakterií. Byla zjištěna různá enzymová aktivita jednak u propolisu produkovaného různými druhy včel nebo propolisu produkovaného stejným druhem včel, ale v různých lokalitách. Silici a Kutluca (2005) potvrdili vyšší aktivitu propolisu od včel *Apis mellifera caucasica* ve srovnání se dvěma jinými poddruhy (*Apis mellifera anatolica* a *Apis mellifera carnica*) chovanými za stejných podmínek (tzn. stejné typy úlů, stejná lokalita). Všechny tři druhy propolisu měly značný antimikrobiální účinek na *S. aureus*, ale podstatně menší na gramnegativní bakterie (*E. coli*), popřípadě na plísně (*Candida albicans*). Al-Ani a kol. (2018) srovnávali antimikrobiální účinek propolisu původem z České republiky, Irska a Německa a zjistili, že všechny vzorky propolisu vykazovaly mírný antibakteriální účinek proti gram-pozitivním mikroorganismům s MIC v rozmezí 0,08 mg / ml až 2,5 mg / ml. Propolisový extrakt ale synergicky zvyšoval účinnost antibiotik, zejména těch, které působí na syntézu buněčné stěny (vankomycin a oxacilin), a to i proti mikroorganismům rezistentním vůči ATB.

Konopný olej se se na rozdíl od některých dalších olejů do pokožky velmi dobře vstřebává a může najít své využití i ve veterinárních přípravcích k ošetření mléčné žlázy. Při zevním použití působí protizánětlivě, regeneračně a antibakteriálně, harmonizuje pH pokožky. Pomáhá obnovovat přirozený ochranný mikrofilm a tím zvyšuje odolnost pokožky vůči negativnímu působení stájového prostředí i lokální mechanické zátěži při dojení zvířat. Výrobky na bázi konopného oleje se stávají vhodným přípravkem využitelným v prvovýrobě mléka k prevenci výskytu mastitid. Nissen a kol. (2010) popsali inhibiční účinky konopného oleje získaného z odrůd Camagnola, Fibranova a Futura na růst grampozitivních i gramnegativních bakterií. Výsledky potvrdily statisticky významný účinek testovaných látek na růst testovaných bakteriálních druhů.

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky je použití a vyhodnocení účinnosti veterinárního přípravku s obsahem včelího medu, propolisu a konopného oleje využitelného k podpůrné léčbě bakteriálních infekcí mléčné žlázy a k ošetření struků dojeného skotu, ovcí a koz v době zaprahování s cílem omezit šíření a přenos původců mastitid v prostředí chovů.

Schválení a certifikace metodiky proběhlo zavedením všech principů „Metodiky“ platných pro rok 2018.

2. Vlastní popis metodiky

Složení a kontrola účinnosti přípravku

Přípravek s včelím medem, propolisem a konopným olejem s názvem „Cannapro DCT“ a jeho příprava je podrobněji popsána a chráněna užitným vzorem (číslo přihlášky - PUV 2018-35395). Základní složkou je voda, Glycpatch® 1.5P, včelí med, konopný olej, DOW Corning RM 2051, xanthanová guma a propolisový extrakt.

Účinnost preparátu byla ověřena na vybrané kmeny původců mastitid (Tabulka 1). Preparát byl testován v červenci 2017, následně uchován v lednici při teplotě 4 ± 1 °C a opakovaně ověřen v říjnu a prosinci 2017, přičemž nevykazoval známky rozkladu nebo kažení. Byla použita semikvantitativní disková difuzní metoda. Do připravených preparátů (koncentrovaný, ředěný 1:10 a 1:100 ve sterilní destilované vodě) byly namočeny prázdné antibiotické disky o průměru 6,3 mm (Oxoid, UK), jako kontrola byl použit sterilní fyziologický roztok. Po odsátí přebytečné tekutiny byly disky položeny na kultivační agarové médium, na jehož povrch byla nalita a poté odsáta příslušná bakteriální suspenze v koncentraci cca 10^6 CFU/ml. Kultivace probíhala aerobně při 37 °C přes noc. Velikost zón (v milimetrech) byla měřena digitálním posuvným měřítkem a výsledky testování jsou uvedeny v Tabulce 2. Koncentrovaný přípravek nebo ředěný v poměru 1:10 vykazoval výrazně lepší inhibiční účinky než přípravek po ředění v poměru 1:100. Při ředění v poměru 1:100 byl již antimikrobiální účinek pouze nepatrný nebo žádný. Inhibiční účinek klesal i s dobou skladování, nicméně po šesti měsících vykazoval téměř shodné účinky, jako při testování na počátku a po čtyřech měsících a nebyl pozorován statisticky významný pokles inhibičního účinku.

Tabulka 1: Přehled testovaných bakteriálních kmenů a jejich původ

Bakteriální kmen:	Označení	Původ
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 3953	sbírkový kmen; klinický izolát
<i>Staphylococcus aureus</i>	52	syrové kravské mléko, izolát z případů mastitid
<i>Staphylococcus aureus</i>	428	MRSA; syrové kravské mléko, izolát z případů mastitid
<i>Staphylococcus aureus</i>	670	MRSA; nosní sliznice chovatele z kozí farmy
<i>Staphylococcus aureus</i>	707	MRSA; syrové kozí mléko, izoláty z případů mastitid
<i>Staphylococcus aureus</i>	625	syrové ovčí mléko, izoláty z případů mastitid
<i>Escherichia coli</i>	CCM 4787	sbírkový kmen; klinický izolát
<i>Streptococcus agalactiae</i>	CCM 6187	sbírkový kmen; syrové kravské mléko
<i>Streptococcus uberis</i>	CCM 4617	sbírkový kmen; subklinická mastitida
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 4224	sbírkový kmen; moč

Tabulka 2: Velikosti inhibičních zón (v mm) pro testované kmény v závislosti na ředění a době skladování přípravku

Bakteriální kmen	Koncentrovaný	Ředění 1:10	Ředění 1:100
Červenec 2017			
<i>S. aureus</i> CCM 3953	9,8	8	6,3
<i>S. aureus</i> 52	10	8	6,3
<i>S. aureus</i> 428	11,5	8	6,3
<i>S. aureus</i> 670	11,5	8	6,3
<i>S. aureus</i> 707	11,5	8	6,3
<i>S. aureus</i> 625	9,8	7,2	6,3
<i>E. coli</i> CCM 4787	9	7,2	6,3
<i>S. agalactiae</i> CCM 6187	10,5	8,6	7
<i>S. uberis</i> CCM 4617	11,5	8	6,3
<i>E. faecalis</i> CCM 4224	11,5	9	6,3
Aritm. průměr	10,7	8,0	6,4
Směr. odchylka	0,91	0,51	0,21
Variační koeficient (%)	8,5	6,4	3,3
Říjen 2017			
<i>S. aureus</i> CCM 3953	8,8	7,4	6,3
<i>S. aureus</i> 52	9,3	7,5	6,3
<i>S. aureus</i> 428	10,5	7,4	6,3
<i>S. aureus</i> 670	9,4	7,5	6,3
<i>S. aureus</i> 707	9,3	7,1	6,3
<i>S. aureus</i> 625	7,5	7,5	6,3
<i>E. coli</i> CCM 4787	8,2	7,2	6,3
<i>S. agalactiae</i> CCM 6187	10	8,6	6,3
<i>S. uberis</i> CCM 4617	10,8	8	6,3
<i>E. faecalis</i> CCM 4224	8,6	7	6,3
Aritm. průměr	9,2	7,5	6,3

Směr. odchylka	0,97	0,44	0,00
Variační koeficient (%)	10,5	5,9	0,0
Prosinec 2017			
<i>S. aureus</i> CCM 3953	8,2	7,0	6,3
<i>S. aureus</i> 52	8,9	7,0	6,3
<i>S. aureus</i> 428	10,4	7,2	6,3
<i>S. aureus</i> 670	9,4	7,4	6,3
<i>S. aureus</i> 707	9,2	7,1	6,3
<i>S. aureus</i> 625	7,5	7,5	6,3
<i>E. coli</i> CCM 4787	8,1	7,2	6,3
<i>S. agalactiae</i> CCM 6187	10	8,6	6,3
<i>S. uberis</i> CCM 4617	10,8	7,9	6,3
<i>E. faecalis</i> CCM 4224	8,6	7	6,3
Aritm. průměr	9,1	7,4	6,3
Směr. odchylka	1,01	0,48	0,00
Variační koeficient (%)	11,1	6,6	0,0

Použití přípravku

Přípravek se aplikuje na struky vemene dojníc před zasušením a v době stání na sucho. Je uchovávan v lednici při teplotě 4 ± 1 °C po dobu expirace, jež byla na základě laboratorního testování stanovena na min. 6 měsíců. Před použitím je přípravek nutné zahřát na pokojovou teplotu (cca 22 °C) a protřepat, aby byl lépe roztíratelný. Po očištění struků, případně i celého vemene běžnými roztoky používanými při dojení nebo zasušování je přípravek důkladně vmasírován ručně nebo pomocí vhodného aplikátoru (např. injekční stříkačka) do pokožky a ústí strukových kanálů a pomáhá tak mechanicky a biochemicky chránit strukový kanálek před vstupem patogenů ve stájovém prostředí a zároveň působí regeneračně na tkáň struku. Konopný olej je přitom vhodným médiem, které pomáhá vstřebání léčivých látek do pokožky. Postup se doporučuje opakovat 2x denně ve 12 hodinových intervalech po dobu minimálně tří dnů a před novou aplikací přípravku je nutné struk očistit od reziduí předchozí aplikace. Po aplikaci je nutné před opětovným vypuštěním zvířete do stáje vyčkat po dobu cca 2 minuty, než dojde k povrchové tvorbě filmu. Vzhledem k tomu, že riziko infekce vzrůstá ke konci zaprahování a na infekci se podílí zejména environmentální patogeny, doporučuje se uvedené ošetření vemene provádět opakovaně týden před koncem této periody.

Kontrola účinnosti

Kontrola účinnosti je prováděna před použitím přípravku a následný den po jeho poslední aplikaci. Z každého struku je asepticky odebrán vzorek mléka o objemu min. 10 ml (postup odběru je shodný s odběrem při vyšetření na původce mastitidy). Vzorky jsou transportovány do laboratoře v termoboxu při teplotě 6 ± 2 °C a ihned analyzovány. V případě

nutného skladování mohou být uchovány před analýzou v lednici při teplotě 4 ± 1 °C po dobu 24 hodin.

Vzorek mléka je vyšetřen na přítomnost původců mastitid, dále je vhodné sledovat i celkový počet mikroorganismů (CPM) a počet somatických buněk (PSB). Inhibiční účinek je stanoven porovnáním rozdílů před a po aplikaci přípravku.

3. Srovnání novosti postupů

Dobrá kondice, vysoká odolnost a dobrý zdravotní stav jsou předpokladem pro vybudování zdravých chovů a pro kvalitní produkci a reprodukci stáda. Důležitým a nepostradatelným faktorem je pak prevence produkčních chorob a pravidelná kontrola zdravotního stavu stáda v době produkce mléka i v období klidu, které je možno rozložit do několika základních etap: období zaprahování, otelení a dále 45., 90., 180. a 270. den laktace (Ticháček, 2007). Výskyt mastitidních infekcí v průběhu reprodukčního cyklu nejlépe vyjadřuje obrázek od autorů Thiel a Dodd (1997). V období zaprahlosti vzniká 2-3x více zánětů mléčné žlázy než v době laktace. Účinnou prevencí tlumení mastitid v době stání na sucho je upustit od plošné léčby mastitid a přistoupit k selektivní léčbě, kontrole účinnosti antibiotik a alternativních přípravků, aby se zabránilo zhoršení zdravotního stavu vemen a šíření subklinických mastitid.

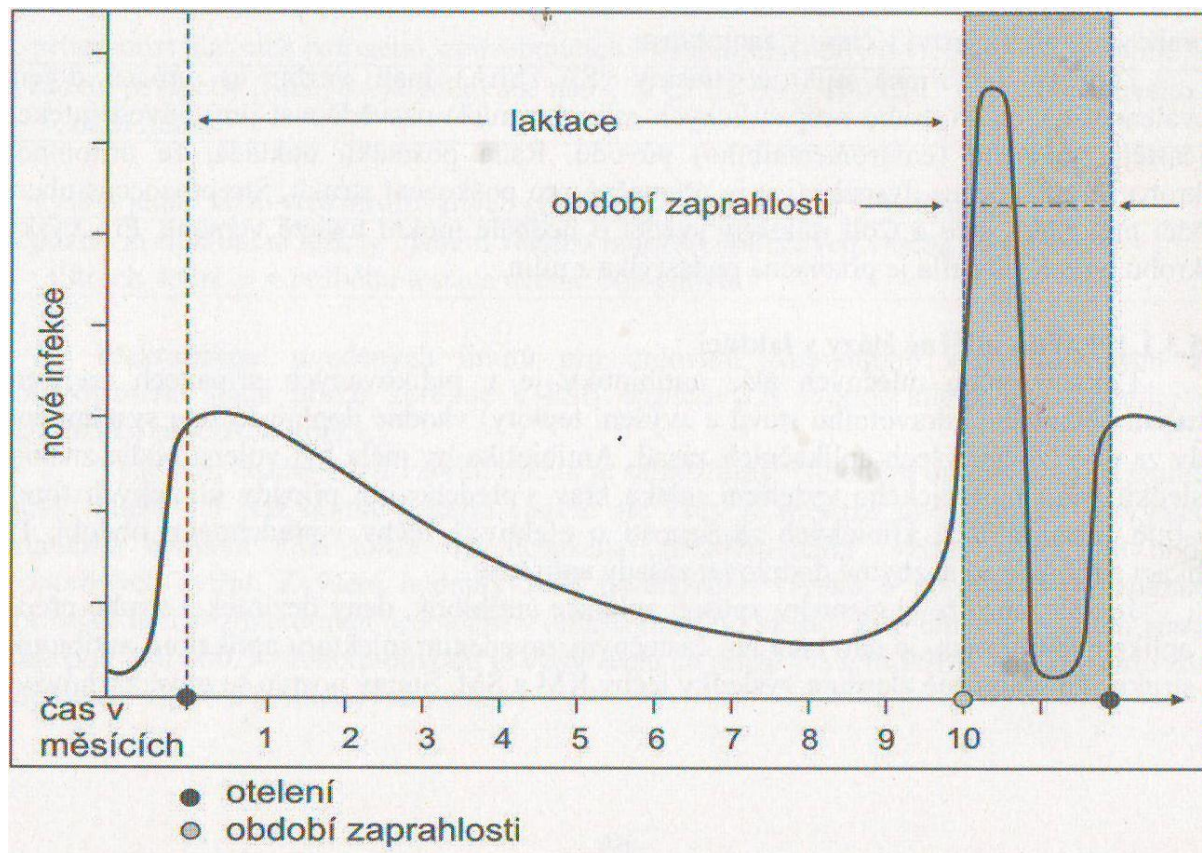
Nelaktující mléčná žláza je velmi citlivá k průniku infekce z vnějšího prostředí a to zejména v první a poslední třetině období stání na sucho. Ve zdravém a správně zasušeném struku se vytváří keratinová zátka, která zamezuje vstupu bakterií. Ve vemeni se ještě několik dní po ukončení laktace může tvořit mléko, pod jehož tlakem se strukový kanálek otevírá a mikroorganismy mohou touto cestou pronikat. Pokud dojde v tomto období k infekci, tato se může projevit až po otelení jako klinická nebo subklinická mastitida.

Pokud dojnice prodělala během laktace mastitidu, případně má vyšší počet somatických buněk, obvykle se aplikují antibiotika. Tento přístup ale může vést k vzniku rezistentních a multirezistentních kmenů bakterií a opakujícím se výskytům zánětů. Alternativní přístup bez použití antibiotik je šetrnější cestou bez rizika vzniku rezistentních původců.

Přípravek s včelím medem, propolisem a konopným olejem je chráněný patentem UV (číslo přihlášky – PUV 2018-35395) a je novinkou v použití alternativních prostředků pro tlumení infekcí mléčné žlázy. Jeho výhoda, ve srovnání s běžně používanými antibiotiky,

spočívá jednak v ekonomicky méně náročných výrobních nákladech a dále v absenci vzniku rezistence.

Obr. 1: Incidence mastitid v průběhu reprodukčního cyklu (Thiel a Dodd, 1997)



4. Popis uplatnění

Potenciálními uživateli metodiky jsou chovatelé dojnic a malých přežvýkavců (ekologické i konvenční chovy), veterinární lékaři, pěstitelé technického konopí, chovatelé včel a také odborná veřejnost (např. výzkumné ústavy, vysoké školy).

Konkrétním uživatelem metodiky je Zemědělské družstvo Jeseník, se kterým je uzavřena smlouva o využití uplatněné metodiky.

5. Ekonomické aspekty

Odhad ekonomického přínosu při eliminaci výskytu mastitid je vyčíslen na základě vynaložených finančních nákladů při léčbě dojeného skotu uživatelem metodiky ZD Jeseník za rok 2017, počet dojnic 511 (z toho léčených krav 120, některé v několika cyklech):

Náklady na veterinární úkony a léčiva:

Celkem veterinární úkony 526 804 Kč

Celkem náklady na léčiva 875 084 Kč

Z toho na mastitidy	361 577 Kč (tj. 41,3 %)	
	z toho ATB na zaprahnutí	67 088 Kč
	z toho ATB v laktaci	294 489 Kč
Náklady na masti při léčbě mastitid	146 940 Kč	
Ztráty zisku za vyloučené mléko	589 475 Kč	(prům. 190 l denně x 8,50 Kč/l x 365 dní)
Náklady na kultivaci patogenů	12 000 Kč	
Náklady na mastitidy celkem	1 109 992 Kč	

Ztráty v důsledku zvýšeného brakování 55 ks ze 176 ks (tj. 31,25 % ze všech brakovaných).

Vyčíslené náklady nepřevyšují i obecně uváděnou kalkulaci nákladů na léčbu jedné dojnice s mastitidní infekcí, která činí 5 000,- Kč.

Ekonomický přínos pro sledovaný chov dojnic spočívá ve snížení celkových nákladů na řešení mastitid v chovu tj. konkrétně snížení nákladů na léčbu, snížení ztrát za neprodané mléko, snížení ztrát z vyrazených dojnic atd. Použitím alternativního léčivého přípravku (100 Kč/100g) lze odhadovat cenu na ošetření dojnic ve stádě na 240 tis. Kč. Současně lze očekávat snížení případů mastitid o 25 - 30 %. S uvedeným souvisí i další ekonomická úspora.

6. Seznam použité literatury

AL-ANI I., ZIMMERMANN S., REICHLING J., WINK M. (2018): Antimicrobial activities of european propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines*, 5(1), 2; doi:10.3390/medicines5010002.

BLOEMENDAAL A. L. A., BROUWER E. C., FLUIT A. D. C. (2010): Methicillin resistance transfer from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a patient during antibiotic therapy. *Plos ONE*, 2010, 5: 1–5.

BOGDANOVIČOVÁ K., VYLETĚLOVÁ-KLIMEŠOVÁ M., BABÁK V., KALHOTKA L., KOLAČKOVÁ I., KARPIŠKOVÁ R. (2016): Microbiological quality of raw milk in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Science*, 34: 189-196.

BOGDANOV S. (1997): Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Food Science and Technology (Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie)*, 30(7): 748-753.

COOPER R.A., MOLAN P.C., HARDING K.G. (2002): The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 857-863.

- ERKMEN O., ÖZCAN M.M. (2008): Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *Journal of Medicinal Food*, 11(3): 587-592.
- GELASAKIS A.I., MAVROGIANNI V.S., PETRIDIS I.G., VASILEIOU N.G.C., FTHENAKIS G.C. (2015): Mastitis in sheep – The last 10 years and the future of research. *Veterinary Microbiology*, 181(1-2): 136-146.
- GUPTA N., LIMBAGO B.M., PATEL J.B., KALLEN A.J. (2011): Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and Prevention, *Clinical Infectious Diseases*, 53(1): 60-67.
- HLEBA L., POCHOP J., FELŠÖCIOVÁ S., PETROVÁ J., ČUBOŇ J., PAVELKOVÁ A., KAČÁNIOVÁ M. (2013): Antimicrobial effect of bee collection pollen extract to *Enterobacteriaceae* genera after application of bee collected pollen in their feeding, *Papers Animal Science and Biotechnologies*, 46(2): 108-113.
- KAČÁNIOVÁ M., VATELÁK A., VUKOVIĆ N., PETROVÁ J., BRINDZA J., NÔŽKOVÁ J., FATRCOVÁ-ŠRÁMKOVÁ K. (2014): Antimicrobial activity of bee collected pollen against clostridia. *Animal Science and Biotechnologies*, 47(2): 362-365.
- KLIMEŠOVÁ M., HANUŠ O., ŘÍHA J., VONDRUŠKOVÁ E., DUŠEK K. (2017): Antibacterial effect of honey on mastitis pathogens. Posterové sdělení na odborném semináři Bentley v Lille (Francie) 2017 (*International Seminar: More value from every sample throughout the whole dairy chain. Convent des Minimes Hotel, Lille, France 2nd - 6th of October, 2017*).
- KLIMEŠOVÁ M., HANUŠ O., VONDRUŠKOVÁ E., NEJESCHLEBOVÁ L., DUŠKOVÁ E., BJELKOVÁ M. (2018): Antibacterial effect of pollen and sugar on selected bee pathogens. *Mlékařské listy*, 29(1): 3-6.
- LUSBY P. E., COOMBES A. L., WILKINSON J. M. (2005): Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Archives of Medical Research*, 36: 464-467.
- MANGA I., VYLETĚLOVÁ M. (2013): A new real-time PCR assay for rapid identification of the *S. aureus*/MRSA strains. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*, 61(6): 1785–1792.
- MÄRGÄÖAN R., MÄRGHITAŞ L.A., DEZMIREAN D.S., GHERMAN B., CHIRILĂ F., ZACHARIAS J., BOBIŞ O. (2015): Antimicrobial activity of bee pollen ethanolic and methanolic extracts on *Staphylococcus aureus*. *Animal Science and Biotechnologies*, 72(1): 78-80.
- MENZIES P.I., RAMANOON S.Z. (2001): Mastitis of sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17(2): 333-358.

- NISSEN L., ZATTA A., STEFANINI I., GRANDI S., SGORBATI B., BIAVATI B., MONTI A. (2010): Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*, 81(5): 413-419.
- RATTAN A., KALIA A., AHMAD N. (1998): Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerging Infectious Diseases*, 4(2): 195-209.
- SILICI S., KUTLUCA S. (2005): Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 69–73
- TAORMINA P.J., NIEMIRA B.A., BEUCHAT L. (2001): Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology*, 69(3): 217-225.
- THIEL C. C., DODD, F. H. (1979): *Machine milking*. Technical Bulletin. Reading: National Institute for Research in Dairying, 1979. ISBN: 9780902219069.
- TICHÁČEK A. (2007): *Poradenství jako nástroj bezpečnosti v prvovýrobě mléka* (Metodika pro praxi). Metodická činnost k podpoře zemědělského poradenského systému, Mze ČR. Vydal Agritec , výzkum, šlechtění a služby, 2007.
- VORLOVÁ L., KARPÍŠKOVÁ R., CHABINIOKOVÁ I., KALÁBOVÁ K., BRÁZDOVÁ Z. (2005): The antimicrobial activity of honeys produced in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, vol. 50, no. 8, p. 376-384.
- VYLETĚLOVÁ-KLIMEŠOVÁ M., HANUŠ O., DUFEK A., NĚMEČKOVÁ I., HORÁČEK J., PONÍŽIL A., NEJESCHLEBOVÁ L. (2014): *Staphylococcus aureus* and other pathogens in relation to breed of cattle and somatic cell count. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(6): 1495-1500.
- VYLETĚLOVÁ M., VLKOVÁ H., MANGA. I. (2011): Occurrence and characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant coagulase-negative Staphylococci in raw milk manufacturing. *Czech Journal of Food Science*, 29: 11-16.

7. Seznam publikací, které předcházely metodice

Jimp

- TANG K., STRUIK P., YIN X., CALZOLARI D., MUSIO S., THOUMINOT C., BJELKOVÁ M., STRAMKALE V., MAGAGNINI G., AMADUCCI, S. (2017): A comprehensive study of planting density and nitrogen fertilization effect on dual-purpose hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivation. *Industrial Crops and Products*. 107, 15, Pages 427-438. 2017. 10.1016/j.indcrop.2017.06.033.

KLIMEŠOVÁ, M., HANUŠ O., TOMÁŠKÁ M., HOFERICOVÁ M., VORLOVÁ L., CHLÁDEK G., JEDELSKÁ R., NEJESCHLEBOVÁ L., VONDRUŠKOVÁ E. (2017): Correlation between total bacterial and somatic cell counts. *Journal of Food and Nutrition Research*, 56, 4, ISSN 1336-8672, 2017, 341-350.

Jrec

KLIMEŠOVÁ M., BJELKOVÁ M., DUŠEK K., HANUŠ O., VONDRUŠKOVÁ E., NEJESCHLEBOVÁ L., ŽÁK P. (2016): Antibakteriální účinek medu na kmeny *Staphylococcus aureus*. *Mlékařské listy-zpravodaj* 158, 27, 5: 1-5.

KLIMEŠOVÁ M., HANUŠ O., VONDRUŠKOVÁ E., NEJESCHLEBOVÁ L., DUŠKOVÁ E., BJELKOVÁ M. (2018): Antibakteriální účinek pylu a cukru na vybrané včelí patogeny. *Mlékařské listy-zpravodaj*, 29, 29(1): 3-6.

O – ostatní

KLIMEŠOVÁ M., HANUŠ O., ŘÍHA J., VONDRUŠKOVÁ E., DUŠEK K. (2017): Antibacterial effect of honey on mastitis pathogens. Posterové sdělení na odborném semináři Bentley v Lille (Francie) 2017 (*International Seminar: More value from every sample throughout the whole dairy chain. Convent des Minimes Hotel, Lille, France 2nd - 6th of October, 2017*).

DUŠKOVÁ M., KARPÍŠKOVÁ R. (2017): Antibakteriální aktivita medu. [Antibacterial activity of honey] In *Hygiena a technologie potravin XLVII. Lenfeldovy a Höklovy dny: Sborník přednášek a posterů*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2017, s. 124-127. ISBN 978-80-7305-793-0

BJELKOVÁ M. a kol. (2017): Periodická zpráva projektu QJ1510047 za rok 2017.

8. Dedikace na projekt

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS QJ1510047.

9. Ostatní

Odkaz na CM

http://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/CM_canapro_2018.pdf

ISBN 978-80-904348-5-1

Podíl autorů na tvorbě certifikované metodiky

doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D. 35%

prof. Ing. Oto Hanuš, Ph.D. 10%

doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D. 35%

Mgr. Jan Říha, Ph.D. 20%

Jména oponentů a organizace, která vydala osvědčení

1) Odborník z daného oboru: MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Branišovská 31a, 370 05 České Budějovice:
faktotum@centrum.cz

2) Pracovník Státní veterinární správy ČR: MVDr. Jiří Hlaváček, SVS ČR, Slezská 7, 120 56 Praha 2:

j.hlavacek@svscr.cz